Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

CHROMOLYMPHOGRAPHIE ALS HILFSMITTEL FÜR DIE LYMPHADENEKTOMIE

Tierexperimentelle Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Anastassios Frangos-Petas
aus Rhodos

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0120

Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

CHROMOLYMPHOGRAPHIE ALS HILFSMITTEL FÜR DIE LYMPHADENEKTOMIE

Tierexperimentelle Untersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Anastassios Frangos-Petas
aus Rhodos

1987

Dekan:	Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Harzmann
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Bockhorn

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODIK	4
1.	Farbstoffe	4
1.1.	Guajazulen	5
1.1.1.	Bestimmung von Guajazulen im Gewebe	7
1.2.	Patentblau	9
1.2.1.	Bestimmung von Patentblau im Gewebe	9
2.	Trägersysteme für die Farbstoffe	11
2.1.	Emulgatoren, Ausbildung von Emulsionen	11
2.1.1.	Lecithin	17
2.1.2.	Tween^{R} 20, Tween^{R} 80	19
2.2.	Jodiertes Öl	22
2.3.	Liposomen	23
3.	Zubereitung der im Tierversuch geprüften Präparate	24
3.1.	Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol-Lösungen	24
3.2.	Zubereitung der Guajazulen-Lecithin-Emulsion	24
3.3.	Zubereitung der Guajazulen-Tween-Lösungen	25
3.4.	Zubereitung von Patentblau-Liposomen	27
4.	Viskositätsmessung der Farbstoffpräparate	28
5.	Technisches Vorgehen zur Durchführung der direkten Chromolymphographie beim Kaninchen	31
5.1.	Narkose	31
5.2.	Technik der experimentellen Chromolymphographie	31
6.	Durchführung der histologischen Untersuchungen	36
III.	ERGEBNISSE	37
1.	Qualitätsprüfung der Zubereitungen	37
1.1.	Stabilität	37
1.2.	Homogenität	37
1.3.	Sterilität	37
1.4.	Viskosität	38

2.	In vivo-Verhalten der Zubereitungen	44
2.1.	Guajazulen-Lipiodol-Lösung	44
2.2.	Guajazulen-Lecithin-Emulsion	49
2.3.	Guajazulen-Tween-Präparationen	49
2.4.	Patentblau-Liposomen	57
IV.	DISKUSSION	64
V.	ZUSAMMENFASSUNG	69
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	70

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Bei lymphatisch metastasierenden Organmalignomen verbessert die Lymphadenektomie die Behandlungsergebnisse. Neben den Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Schilddrüse, der Mamma, des Bronchialsystems und bei Karzinomen der inneren und äußeren weiblichen Genitale ist die Lymphadenektomie auch bei urologischen Malignomen von großer Bedeutung. Das Hodenkarzinom, das Prostatakarzinom, das hypernephroide Karzinom sowie urotheliale Tumoren der ableitenden Harnwege einschließlich der Harnblase sind die Beispiele hierfür (62). Nach der Einführung der retroperitonealen Lymphadenektomie beim embryonalen Teratokarzinom des Hodens, 1945, wurde die 5-Jahres-Überlebensrate um mehr als 30 % verbessert (4, 21, 24, 25, 69). Seit 1980 wird die transperitoneale Lymphadenektomie nicht mehr ausnahmslos als radikaler Eingriff durchgeführt, wobei man alle paraaortalen, intraaortikokavalen und parakavalen Lymphknoten reseziert. Vielmehr wird -allerdings unter Voraussetzung niedriger Tumorstadien - eine modifizierte Lymphadenektomie mit unterschiedlicher Resektionsbegrenzung bei rechtsseitigen und linksseitigen Tumoren durchgeführt (5, 58, 69). Der Grund ist, daß nach Radikaloperation in mehr als 70 % der Fälle Ejakulationsstörungen (Impotentia generandi) bei den so behandelten Patienten resultieren. Die Verletzungen des im Retroperitonealraum liegenden autonomen Nervensystems werden als Ursache dieser Komplikation nach Lymphadenektomie betrachtet. Als Folge dieser Verletzungen beobachtet man eine Innervationsstörung entweder des Nebenhodens, des Samenleiters und der Samenblase (Samentransportstörung) oder des Harnblasenhalses (retrograde Ejakulation) (49, 54). Die Tatsache, daß die Strukturen des lymphatischen Systems intraoperativ nicht zweifelsfrei vom benachbarten Gewebe abgegrenzt werden können, macht die

ungenügende Selektivität der retroperitonealen Lymphadenektomie bei Hodenkarzinom verständlich (66).

Die Darstellung von retroperitonealen Lymphknoten hat diagnostische und therapeutische Bedeutung. Die radiologische Darstellung von Lymphknoten ist seit 30 Jahren klinische Routine. Nach dieser im Jahre 1952 (28, 29) eingeführten Technik wurden weltweit Patienten untersucht, bei denen ein Verdacht auf maligne Veränderungen der Lymphknoten bestand. Dank der Lymphographie ist eine weitgehende exakte Aussage über die Größe und innere Struktur von tiefliegenden Lymphknoten möglich. Die Lymphabflußstörungen und durch Metastasen verursachte Kontrastaussparungen sind gut darstellbar. Keine der modernen Methoden, die später die klinische Anwendung fanden (Computertomographie, Sonographie, Kernspintomographie) sind in der Lage, genauere Aussagen über den Zustand der retroperitonealen Lymphknoten zu machen (9, 48).

Die Lymphographie mit einfachen öligen Kontrastmitteln ist jedoch nur bis zum Zeitpunkt der Operation behilflich. Intraoperativ ist die Identifizierung von lymphographierten Lymphknoten ebenso schwer, wie bei Patienten ohne Lymphographie. Aus diesem Grund haben zahlreiche Autoren versucht, mit Hilfe der Lymphographie verschiedene Farbstoffe ins Lymphgefäßsystem einzubringen. Überwiegend wurde versucht, zusätzlich zum jodhaltigen Lipiodol^{R} (Byk Gulden, Konstanz) Chlorophyll (15, 71) zu injizieren. Vereinzelt wurden auch die anderen Substanzen geprüft: Primulingelb (63), Na-Fluorescein (63), Chromolymphotrast (59, 60), Tusche (64), Kohlenstoff (35, 36), Xantophyll (35, 36). Keine dieser Substanzen erwies sich als für die breite klinische Anwendung geeignet (8, 10, 12).

Zum Zwecke der selektiven Lymphadenektomie war darüberhinaus die radioisotopenkontrollierte Lymphadenektomie geeignet (33). Sie stellt

jedoch erhebliche technische Anforderungen und erlaubt keine ausreichende Detailzeichnung.

In den letzten Jahren wurde für diesen Zweck eine neue Substanz etabliert (21, 24). Es handelt sich um Guajazulen, welches in Lipiodol gut lösbar ist und eine tiefblaue Färbung der Lymphknoten über eine längere Zeit gewährleistet. Die Anwendung dieser Guajazulen-Chromolymphographie-technik hat bereits klinische Reife erreicht (21, 24). Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß nach klinisch durchgeführter Chromolymphographie der Farbstoff doch relativ schnell aus den Lymphknoten verschwindet, weswegen es erforderlich ist, möglichst frühzeitig nach Chromolymphographie zu operieren, um eine gute intraoperative Lymphknoten-Erkennbarkeit gewährleisten zu können. Die zeitraubende und aufwendige Lymphadenektomie sollte aber nach Möglichkeit nicht unmittelbar nach einer Chromolymphographie erfolgen. Wichtigster Grund dafür ist, daß nach Infusion der öligen Trägersubstanz Lipiodol^{R} in das Lymphsystem ein Teil des injizierten Stoffes über den Ductus thoracicus in die Lunge übertritt und in den Lungenkapillaren gelagert wird. Bei deutlicher Überschreitung der Aufnahmekapazität des Lymphsystems können Lungenölembolien resultieren (3). Sollte zu dieser erheblichen Belastung noch eine mehrstündige Operation kommen, können Respirationsstörungen die Folge sein.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob eine Chromolymphographie mit einer anderen als einer rein öligen Trägersubstanz möglich ist. Es sollte versucht werden, den Ölgehalt in den Präparationen zu mindern, oder vollständig zu eliminieren. Zu prüfen war, ob die Emulgierung bzw. Lösung des Farbstoffs in Emulgatoren oder seine Einschließung in Liposomen die Ergebnisse verbessern und die oben erwähnten Nachteile der rein öligen Substanzen reduzieren kann.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Farbstoffe:

Von den für die Lymphknotenfärbung geeigneten Farbstoffen werden folgende Eigenschaften erwartet:

Intensiver Kontrast

Bioverfügbarkeit

Geringe Toxizität und onkologische Unbedenklichkeit

Keine permanente Hautfärbung

Gute Sterilisierbarkeit

Gute Löslichkeit in öligem oder wässrigem Trägermedium

Ausreichender Depot-Effekt in Lymphknoten

Die Untersuchungen wurden mit zwei Farbstoffen durchgeführt; einem lipidlöslichen (Guajazulen) und einem wasserlöslichen (Patentblau). Beide Farbstoffe sind tiefblau und erlauben dadurch eine leichte Identifizierung von damit gefärbten Gewebestrukturen.

Die grünen (Chlorophyll, Chromolymphotrast) und roten (Xantophyll) Farbstoffe wurden wegen ihrer wesentlich schlechteren Identifizierbarkeit nicht untersucht.

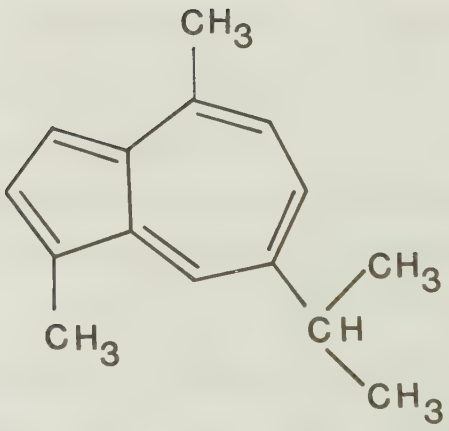
Aufgrund bekannter Daten (21, 37) ist davon auszugehen, daß die genannten Substanzen nicht zur Tumorinduktion führen. In Öl gelöstes Guajazulen und in Wasser gelöstes Patentblau verursachen nach Lymphographie keine bleibende Verfärbung der Haut. Beide lassen sich auch gut sterilisieren.

Die oben genannten Eigenschaften waren Grundbedingung zur weiteren Prüfung beider Substanzen.

1.1. Guajazulen

Es handelt sich um einen Farbstoff (1,4 Dimethyl-7-Isopropylazulen), der dem Wirkstoff der Kamille entspricht. Abb. 1 zeigt die Strukturformel. Für weiße Mäuse beträgt die LD 50 von Guajazulen 800 mg/kg Körpergewicht. Der fettlösliche Farbstoff Guajazulen wurde nach intraperitonealer Verabreichung bei Ratten auch bezüglich seiner Metaboliten auf mutagene bzw. karzinogene Wirkung untersucht (21). Als Methodik wurde der Ames-Test, ein bakterieller Mutagenitätstest, verwendet (1). Während die Stämme von Salmonella typhimurium in histidinfreien Nährböden nicht wachsen, bilden die bei Anwesenheit von mutagenen/karzinogenen Substanzen entstehenden Revertanten (Wildformen von Salmonella typhimurium) auf diesen Böden Kolonien, die somit die Anwesenheit eines Mutagens bzw. Karzinogens signalisieren (1, 22, 23). Bei diesem Test induzierte Guajazulen keine Revertantenbildung. Versuche bei 11 Bastardhunden und 4 Zwergschweinen (21) zeigten nach Chromolymphographie bei Lipiodol^{R}-Guajazulen keine histologischen Veränderungen außer den bekannten Lymphographiefolgen.

In dieser Arbeit wurde versucht, Guajazulen-Präparationen ohne Öl oder mit niedrigem Ölgehalt herzustellen. Die Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung diente als Kontrolle.



Guajazulen

Abb.1: Strukturformel des fettlöslichen Farbstoffes (1,4 Dimethyl-7-Isopropylazulen)

1.1.1. Bestimmung von Guajazulen im Gewebe:[1]

A) Gewebshomogenisierung

Das Teflongefäß mit Kugel und Deckel sowie das Gewebsstück wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt.

Das gefrorene Gewebsstück wurde zerkleinert und in das Teflongefäß eingefüllt. Nach dem Schließen wurde das Gefäß sofort in den Homogenisator (Mikro-Dismembrator II) eingeschraubt.

Anschließend wurde 50 - 60 Sekunden homogenisiert.

Das Homogenisat wurde bis zur Verarbeitung eingefroren.

B) Analyse

Das Homogenisat, 0,5 - 2,5 g (je nach Gewebe unterschiedlich), wurde mit aqua dest. auf 20 g eingestellt und 30 Minuten geschüttelt. (IKA-Schüttler, Bachofer).

15 Minuten nach dem Aufbringen auf eine Säule mit Extrelut^{20} (Diagnostika, Merck) wurde mit 75 ml Essigsäureethylester extrahiert.

Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer bis auf ca. 5 ml und anschließend mit Stickstoff auf 1 ml (blau gefärbte Lymphknoten auf 10 ml) eingeengt.

Das filtrierte Eluat (HV-Filter 0,45 um, Millipore) wurde am Hochdruckflüssigkeitschromatographen gemessen.

[1] Die hier aufgeführten Untersuchungen wurden im Labor von Herrn P.D. Dr. Schweinsberg, Hygiene-Institut der Universität Tübingen, bearbeitet.

HPLC-Aufbau:

Pumpe: 2150 LKB

Controller: 2152 LKB

Dedektor: 2151 Variable Wavelength Monitor LKB

Integrator: Modell C-R3A Chromatopac, Shimadzu

Säule: Partisil 10 ODS-3 Micro-B/25, Whatman

HPLC-Messbedingungen:

Mobile Phase: 83 % Methanol + 17 % H_2O-bidest

UV-Detektion: 282 nm

Durchflußrate: 0,10 ml/min

Probenvolumen: 1 µl

Druck: ca. 100 bar

Retentionszeit von Guajazulen: 6 - 7 Min.

Säulentemperatur: Zimmertemperatur

1.2. Patentblau V

Dieser Farbstoff wird seit Jahren als Hilfsmittel bei der Lymphographie verwendet. Er wird selektiv durch die Lymphgefäße abtransportiert. Die dadurch erzielte tiefblaue Färbung ermöglicht eine gute Identifizierbarkeit der Lymphgefäße.

Abb. 2 zeigt die Strukturformel der Substanz deren physikochemische Eigenschaften aus der Literatur bekannt sind (45, 46).

Die handelsübliche Lösung (Byk Gulden, Konstanz) ist 2,5 %ig und durch Zusatz von NaCl isotonisch. Die LD 50 ist hoch und beträgt nach i.v.-Injektion bei der Ratte 0,5 g/kg, bei der Maus 1,0 g/kg Körpergewicht. Bei der Prüfung der chronischen Toxizität (19 Monate) wurden insgesamt 80 g des Farbstoffes pro Ratte ohne Nachweis von Nebenwirkungen verabreicht.

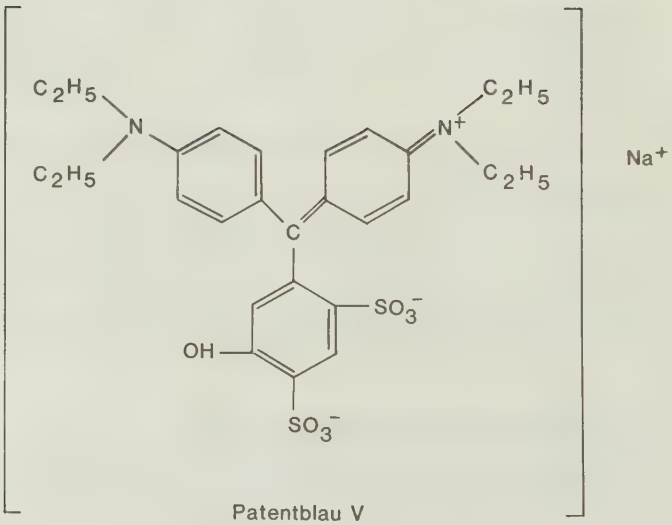
Patentblau V wird nach 24 bis 48 Stunden vorwiegend über die Nieren ausgeschieden (37).

Es kann wegen der schnellen Ausscheidung nur dann als Depot-Präparat verwendet werden, wenn es an ein Trägersystem gebunden wird.

In dieser Arbeit wurden als Träger die Lipidvesikel verwendet.

1.2.1. Bestimmung von Patentblau im Gewebe

Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Mikrodismembrators pulverisiert. Das Gewebe wurde dann mit NaCl aufgelöst und 6 Stunden geschüttelt. Die hämoglobinhaltigen Proben wurden enteiweißt durch kurzes Erhitzen. Danach wurden alle Proben 30 Minuten bei 27.000 xg zentrifugiert. Patentblau wurde im klaren Überstand mit Hilfe der Absorption bei 630 nm bestimmt.



Patentblau V

Abb.2: Strukturformel des Patentblau V (2,4 Disulfo-5-hydroxy-4-4"-bis-(diäthylamino)-triphenylcarbinolmononatriumsalz)

2. Trägersubstanzen für die Farbstoffe

2.1. Emulgatoren, Ausbildung von Emulsionen

Emulgatoren sind oberflächenaktive Stoffe, deren langgestreckte, kettenförmige Moleküle aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil bestehen. Sie fördern die Bildung von Emulsionen durch Herabsetzung der Oberflächenspannung. Die Emulgatoren werden unterschieden in ionogene und nicht ionogene. Die ionogenen untergliedern sich weiter in kationaktiv (wenn für die Emulgatorwirkung das Kation zuständig ist), anionaktiv (wenn das Anion der Aktivteil ist) und amphoter, wenn sie über Anion und Kation verfügen.

Schematisch werden die Emulgatoren mit Band und Kugel dargestellt (68), wobei die Kugel dem hydrophilen und das Band dem lipophilen Anteil entspricht (Abb.3).

Die Emulgatoren im Wasser sammeln sich in Form eines Emulgatorenfilms an der Oberfläche. Ihre Moleküle orientieren sich so, daß sich die hydrophylen Gruppen nach der wässrigen Phase und die lipophilen Gruppen nach der Gasphase (Luft) hin ausrichten (Abb.4).

Eine Emulsion besteht aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Die eine ist hydrophil, die andere lipophil. Eine Emulsion ist dann stabil, wenn der Emulgatorfilm lückenlos ist. Sonst können die einzelnen Emulsionskügelchen bei Berührung mit nicht durch die oberflächenaktiven Substanzen bedeckten Stellen zusammenfließen. Die hydrophile (lipophobe) Phase zur Ausbildung von Emulsionen entspricht meistens Wasser oder einer mit Wasser mischbare Flüssigkeit. Die lipophile (hydrophobe) Phase ist ein Lipid oder ein lipophiles Lösungsmittel wie z. B. Chloroform oder Methanol.

Man kann nun entweder die hydrophile Phase in der hydrophoben Phase

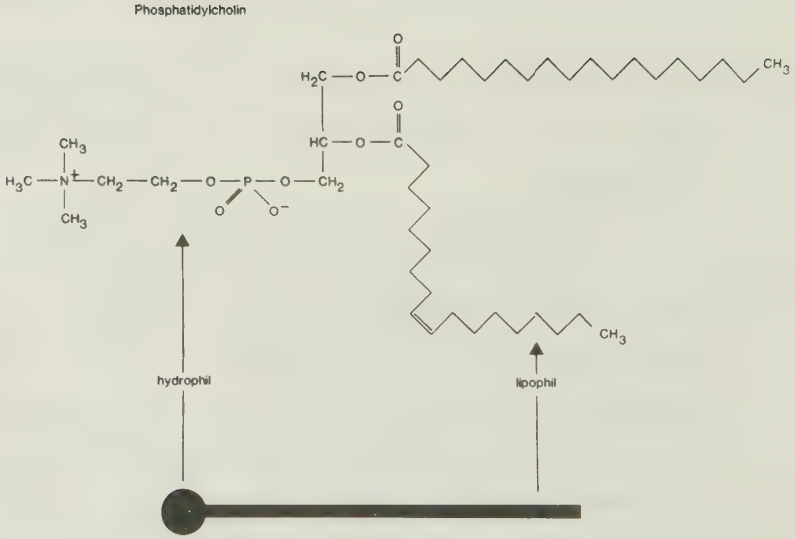


Abb.3: Lecithin (Phosphatidylcholin):
Das Band symbolisiert den lipophilen, die Kugel den hydrophilen Anteil des Emulgators.

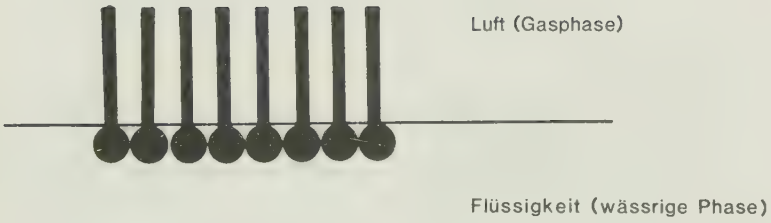


Abb.4: Anordnung der Emulgatormoleküle an der Grenzfläche.

oder die hydrophobe in der hydrophilen Phase dispergieren. Es bilden sich somit zwei verschiedene Emulsionssysteme, die als Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) bzw. Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion) bezeichnet werden. Außer diesen einfachen O/W und W/O Emulsionssystemen bestehen noch die doppelten Emulsionssysteme. In diesem Falle befinden sich in den Emulsionskügelchen nochmals Kügelchen der anderen Phase. Solche Systeme werden als W/O/W- oder O/W/O-Emulsionen bezeichnet (Abb.5). In dieser Arbeit wurde als Muster die einfache O/W-Emulsion geprüft.

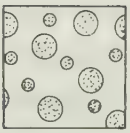
Die Ausbildung von Emulsionen wird bestimmten Regeln unterworfen. In dieser Arbeit wurde von folgenden Regeln Gebrauch gemacht:

Bancroftsche Regel

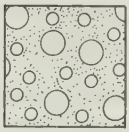
Durch diese Regel wird im voraus der Emulsionstyp festgelegt, der bei Verwendung der Einzelemulgatoren entsteht. Im allgemeinen entsteht eine W/O-Emulsion, wenn der Emulgator in Öl gelöst ist.
Sie gilt als Faustregel, da die Ausbildung einer Emulsion abhängig ist vom Verhältnis des Phasenvolumens, der Temperatur, der Viskosität der Phasen, der Herstellungstechnik u.a.

Keiltheorie

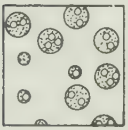
Durch diese Theorie wird das Verhalten der Emulgatoren an der Grenzfläche gut dargestellt. Sie erklärt, weshalb bestimmte Emulgatoren eine O/W-Emulsion und andere eine W/O-Emulsion bilden. Hier wird der geometrische Bau des Emulgators berücksichtigt. Die wasserlöslichen Emulgatoren z.B. besitzen einen sperrigen und raumfüllenden hydrophilen Anteil. Deswegen und infolge der Hydratation ist die Rundung des Emulgatorfilms verständlich (Abb.9). Bei den lipophylen Emulgatoren



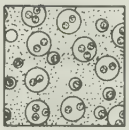
Öl
Wasser
Schema einer O/W-Emulsion



Öl
Wasser
Schema einer W/O-Emulsion



Öl
Wasser
Wasser in Öl
Schema einer W/O/W-Emulsion



Öl
Wasser
Öl in Wasser
Schema einer O/W/O-Emulsion

Abb.5: Schematische Darstellung der Emulsionstypen.

führt der Keileffekt zur Biegung der Grenzfläche um das Wassertröpfchen (Phosphatidilcholin):

Das Band symbolisiert den lipophilen, den Kugel den hydrophilen Anteil des Emulgators (68).

HLB-Wert

Unter HLB-Wert (hydrophiler-lipophiler-Balance-Wert) versteht man das Gleichgewicht, das zwischen hydrophilen und lipophilen Gruppen besteht. Er hängt von der Stärke und Größe der hydrophilen und lipophilen Gruppen ab. Eine lipophile Substanz hat einen niedrigen, eine hydrophile einen höheren HLB-Wert. Wenn also einer lipophilen Substanz eine hydrophile Gruppe zugeführt wird, dann verschiebt sich das hydrophil-lipophile Gleichgewicht zugunsten des hydrophilen Teils. Man kann auf diese Weise W/O-Emulgatoren in O/W-Emulgatoren umwandeln. Das HLB-Wertsystem ist mit einer Zahlenskala von 1 - 20 bestimmt. Ein Tensid mit hunderprozentig hydrophilem Anteil hätte dann einen HLB-Wert von 20. Einem Emulgator, dessen hydrophile und lipophile Anteile gleich sind, entspricht ein HLB-Wert von 10. Anders ausgedrückt hat Tween 20 mit einem HLB-Wert von 16,7 einen hydrophilen Anteil von 84 %.

Phasenumkehr

Wenn ein hydrophiler Emulgator einer Ölphase hinzugefügt wird, entsteht zunächst eine W/O-Emulsion. Durch Wanderung des Emulgators (z.B. durch Gabe von Wasser) kann sich die W/O-Emulsion in eine O/W-Emulsion umkehren (Phasenumkehr). Die erforderliche Temperatur zur Umkehr (Phasenumkehrtemperatur) ist charakteristisch für jede Emulsion, die mit nichtionogenen Emulgatoren hergestellt ist.

Folgende Emulgatoren wurden in dieser Arbeit benutzt:

2.1.1. Lecithin

Lecithine sind wichtige Bestandteile der biologischen Zellmembranen, sie kommen in allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor. Lecithine gehören der Gruppe der Lipide an. In der älteren Literatur versteht man unter dem Namen Lecithin den Teil der Phospholipide, welcher im Alkohol löslich ist und vorwiegend aus Phosphatidylcholin besteht. Im heutigen Sinne ist Lecithin ein Gemisch, bestehend aus unpolaren (neutralen) und polaren Lipiden (Phosphor- und Glycolipide). Abb. 3 zeigt die Strukturformel des Lecithins.

Phospholipide stellen aufgrund des lipophilen Teils (Alkylkette der Fettsäure) und des hydrophilen Teils (Phosphatgruppe und Alkoholreste) amphiphile Moleküle dar. Bei den Phospholipiden (30, 44) kommt es beim Übergang von der festen zur flüssigen Phase zu einigen endothermen Phasenumwandlungen (Abb. 6).

In solchen mesomorphen Phasen können sowohl wasserlösliche, als auch fettlösliche Stoffe eingeführt werden. Das ist auch das hauptsächliche Einsatzgebiet der Phospholipide als Emulgatoren. Sojalecithin ist bei einem HLB-Wert von etwa 10 sowohl zur Stabilisierung von O/W- als auch W/O-Emulsionen geeignet. Darüberhinaus besitzt es ausgezeichnete dispergierende Eigenschaften. Als Emulgator wird Lecithin in der Pharmazie zur Herstellung von parenteralen Lösungen verwendet.

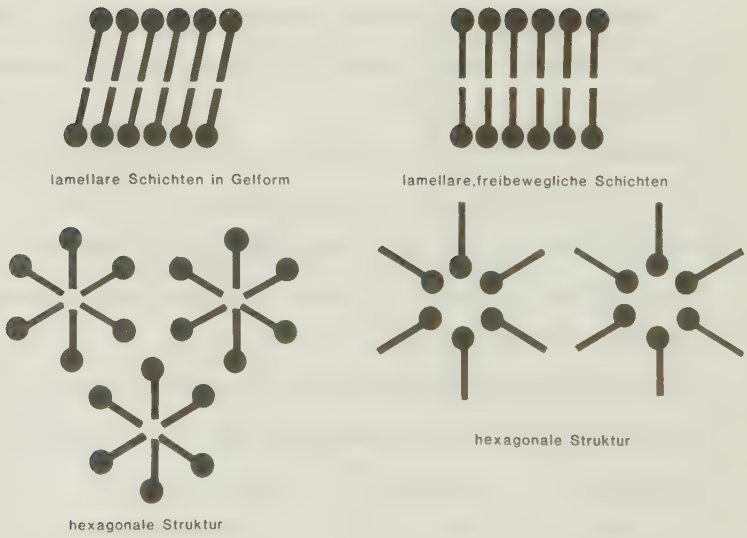


Abb.6: Wechselwirkung der Phospholipide mit Wasser (Phasenumwandlungen im Wasser).

2.1.2. Tween^{R} 20, Tween^{R} 80

Tweens sind nicht ionogene O/W-Emulgatoren, die aus dem Sorbitan entstehen. Tween^{R} 20 (Abb. 7) ist ein Polyäthylenglykol-Sorbitan-Monolaurat, Tween^{R} 80 (Abb. 8) ist ein Polyäthylenglykol-Sorbitan-Monooleat.

Tween^{R} 20 ist eine hellgelbe Flüssigkeit mit HLB-Wert von 16.7, und einer Viskosität (25 Grad), 250-450-mPa · s. Tween^{R} 80 ist ebenfalls eine gelbe visköse Flüssigkeit mit einem HLB-Wert von 15,0 und einer Viskosität von (25 Grad), 375-480 mPa · s. Tweens besitzen oberflächenaktive und solubilisierende Eigenschaften, weshalb sie als O/W-Emulgatoren verwendet werden. Die DL-50-Rate (oral) bei Tweens beträgt über 39 g/kg (13). Die Tweens werden aus dem Organismus schnell eliminiert. Nach i.v.Gabe von 0,5 g/kg des radioaktiv markierten Tween^{R} 20 an Ratten war im Organismus nach 24 Stunden nur noch 1,5 % der verabreichten Dosis nachweisbar (13). Von Haut und Kaninchenauge werden diese Sustanzen reaktionslos vertragen. Nebenbei kann Tween^{R} 80 das Wachstum Ehrlich-Aszites-Tumorzellen hemmen (34).

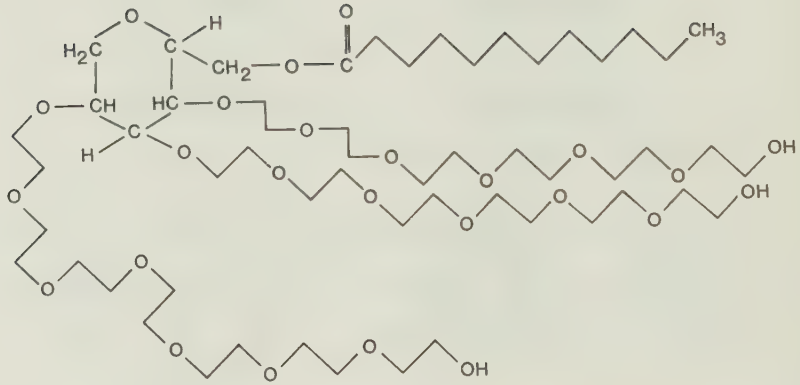


Abb.7: Strukturformel des Polyäthylenglykol-Sorbitan-Monolaurat (Tween^{R} 20).

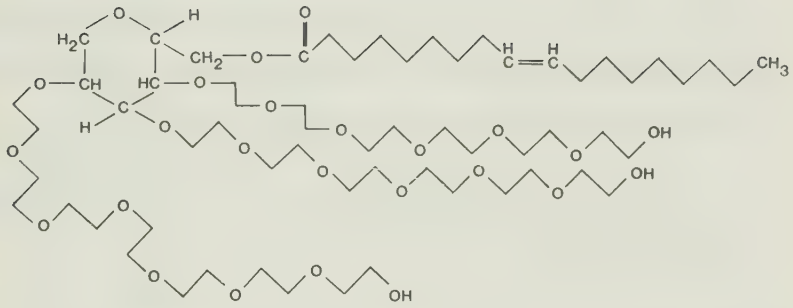


Abb.8: Strukturformel des Polyäthylenglykol-Sorbitan-Monooleat (Tween^{R} 80).

2.2. Jodiertes Öl

Lipiodol^{R} Ultra-Fluid ist ein Gemisch von Äthylestern der Fettsäuren des jodierten Oleum Papaveris, und zwar vorwiegend ein Dijodstearinsäureäthylester. 1 ml der Substanz enthält 480 mg Jod. Die Viskosität ist temperaturabhängig und beträgt bei 15 ^{o}C, 65 m.Pa.s, bei 37^{o}C 25 mPa.s.

Lipiodol^{R} wird seit Jahren als öliges Kontrastmittel für die Lymphographie und Fistulographie verwendet. Die 1952 von Kinmonth (28) eingeführte Lymphographie stellte durch Vitalfärbung des Lymphgefäßes, direkte Punktion des freigelegten Lymphgefäßes und intravasale Injektion eines Kontrastmittels das retroperitoneale Lymphsystem dar.

Die Anwendung von Lipiodol^{R} lieferte bessere Resultate als wässrige Kontrastmittel, die durch frühzeitige Diffusion in das paravasale Gewebe keine befriedigende Darstellung des Lymphsystems gewährleisteten.

Das endolymphatisch injizierte Lipiodol^{R} kann über den Ductus thoracicus die Blutbahn erreichen und zu Mikroölembolien bzw. kleinen Infarkten der Lunge führen (14).

2.3 Liposomen

Die Funktion eines Trägers für die Einbringung von Farbstoffen in das lymphatische System kann möglicherweise von Liposomen erfüllt werden. Gegenüber herkömmlichen Präparationen besitzen die Liposomen zahlreiche günstige Eigenschaften.

Liposomen sind kleine Phospholipidvesikel, die je nach Präparationsart sehr in Form und Größe variieren. Es ist möglich, sowohl uni- als auch polylamelläre Vesikel herzustellen, mit einem Durchmesser zwischen wenigen Nanometern bis zu wenigen Mikrometern. Die Liposomen werden überwiegend aus natürlichen Lipiden gebaut, weshalb sie voll bioverfügbar und mehrheitlich nicht toxisch sind. Der geringe Vesikeldurchmesser läßt selbst die intravenöse Infusion zu. Die bei anderen Präparationen häufig feststellbare pulmonale Belastung ist hier nicht gegeben.

Arbeitshypothese war:

- daß der in Liposomen eingeschlossene Farbstoff über die Lymphbahnen transportiert wird, ohne in das umgebende Gewebe zu diffundieren,
- daß der Farbstoff eingeschlossen in Liposomen im Lymphknoten in hoher Konzentration gespeichert wird und
- daß Liposomen das lymphatische Gewebe wesentlich geringer komprimieren als dies von öligen Präparationen bekannt ist.

3. Zubereitung der im Tierversuch geprüften Präparate

3.1 Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung

Guajazulen und Lipiodol^{R} wurden im notwendigen Mengenverhältnis in ein sterilisiertes Glas eingewogen. Nach kurzer Stickstoffbegasung wurde das Gefäß verschlossen und für 60 Minuten in einen Magnetrührer[1] gebracht. Dann erfolgte die Sterilfiltration der Lösung[2] und anschließend die Abfüllung in 10 ml Durchstech-Ampullenfläschen.

Sämtliche Arbeiten wurden aseptisch unter Lamina-flow-Bedingungen durchgeführt[3]. Die Lösungen wurden vor Anwendung auf Sterilität geprüft[4].

3.2. Zubereitung der Guajazulen-Lecithin-Emulsionen

Als Lecithinprodukt diente das Epikuron^{R} 135 (Lucas Meyer, Hamburg). Zur Herstellung der Emulsion wurden 10 g Lecithin und 10 g Wasser in ein sterilisiertes Glas eingewogen, und über ca. 15 Stunden bei 8° C stehengelassen. Das so vorgequollene Lecithin wurde dann mit einem sterilen Spatel und anschließend mit Hilfe eines Ultraschallgerätes[5] dispergiert.

[1] IKA, Stauffen

[2] Edelstahl-Filtrationsgerät, Sartorius, Göttingen

[3] die Sterilfiltration erfolgte in der Universitätsapotheke Tübingen

[4] die Sterilitätskontrollen erfolgten im Hygieneinstitut der Universität Tübingen

[5] Branson, USA

Nach weiterer Lagerung bei 8° C über 15 Stunden wurden 10 g des 70 %igen Alkohols hinzugefügt, um eine O/W-Emulsion herzustellen. Unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer wurden anschließend 10 g des Guajazulen in kleinen Portionen hinzugefügt. Es kommt zur Ausbildung einer cremigen Emulsion (Abb. 9). Durch Zugabe von weiteren 60 g Wasser in einer Geschwindigkeit von ca. 4 ml/Minute kommt es zur raschen Verflüssigung der Emulsion.

Die so gewonnene 100 g Emulsion besteht aus 10 % Lecithin, 10 % Guajazulen, 10 % Alkohol und 70 % Wasser. Die Emulsion wird dann über einen Filter von Durchmesser 47 mm und Porenweite 0,2 µ steril mit ca. 4 bar Stickstoffdruck auf 10 ml Durchstechampullenfläschchen verteilt. Vor Anwendung der so hergestellten Emulsionen erfolgte eine bakteriologische Kontrolle der Sterilität.

3.3. Zubereitung der Guajazulen-Tween^{R}-Präparationen

Die zwei Emulgatoren, Tween^{R} 20 und Tween^{R} 80, wurden jeweils mit den gewünschten Guajazulenmengen in ein sterilisiertes Glas eingewogen. Nach kurzer Stickstoffbegasung erfolgte der Verschluß des Gefäßes und mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die Lösung ca. 40 Minuten bearbeitet. Dann wurde die Flüssigkeit in ein Edelstahlfiltrationsgerät umgefüllt, danach die sterile Filtration unter 4 bar Stickstoffdruck in 10 ml Durchstechampullenfläschchen. Die Sterilfiltration wurde wie bei den vorgenannten Präparaten mit Filtern aus regenerierter Zellulose mit Porenweite von 0,20 µ durchgeführt. Die Guajazulen-Tween^{R} 20-Emulsion wurde mit 40 % Wasser zubereitet. Der Guajazulen-Anteil betrug 20 %. Das Tween^{R} 80 wurde mit 10 % Guajazulen zubereitet. Präparate wurden auf Sterilität (Pilze, Bakterien) wie die zuvor beschriebenen Präparate geprüft.

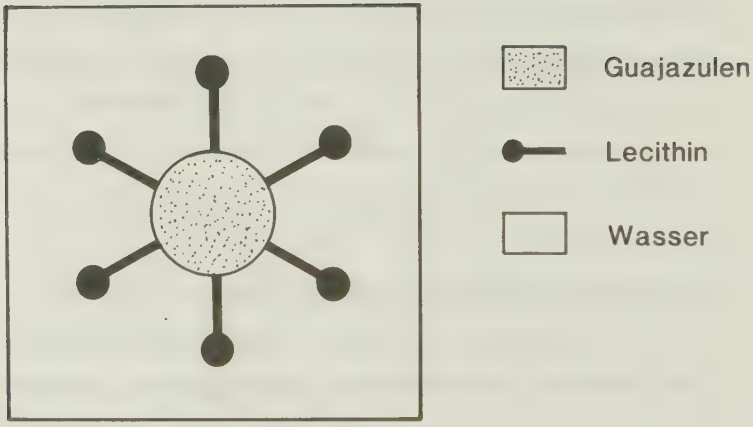


Abb.9: Schematische Darstellung der O/W-Emulsion mit Lecithin und Guajazulen.

3.4 Zubereitung von Patentblau-Liposomen-Präparationen

Unter zahlreichen Herstellungsmethoden existierte bisher nur eine, die zur Entstehung von exakt definierbaren Liposomen führt. Es handelte sich um eine Detergenzdialysemethode, die in einem Spezialgerät (Liposomat, Dianorm München) angewandt wird. Die Verwendung dieses Gerätes hat folgende Vorteile:

1. Sehr schnelle Entstehung von Liposomen,
2. gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter standardisierten Bedingungen,
3. Herstellungsmöglichkeiten von allen Typen von Liposomen in extremen Größenunterschieden (25 - 600 ng) unter leicht steuerbaren Bedingungen,
4. die Möglichkeit zum Einsatz von sehr hohen Lipidkonzentrationen (bis 300 mg/ml),
5. sehr hohe Anschlußrate sowohl von wasserlöslichen als auch lipidlöslichen Substanzen,
6. niedriger Verlust von Lipiden (nur etwa 2 % der eingesetzen Menge).

Die mit dem oben beschriebenen Gerät hergestellten Liposomen wurden für Tierversuche zur Verfügung gestellt. Sie enthielten 0,8 % Patentblau. Diese Konzentration war ausreichend, um eine tiefblaue Konzentration der Präparation zu erzielen.

4. Viskositätsmessung der Farbstoffpräparate

Das Fließverhalten von Flüssigkeiten bzw. die Deformation von Feststoffen unter dem Einfluß äußerer Kräfte beschreibt die Rheologie (Fließkunde). Das rheologische Verhalten von Pharmaka ist von großer Bedeutung hinsichtlich ihrer physikalischen Stabilität, biologischen Verfügbarkeit und ihrer Applikationsmöglichkeiten.

Ihrem Fließverhalten nach unterscheidet man Newtonsche von den Nicht-Newtonschen Systemen. Eine Flüssigkeit beginnt unter dem Einfluß einer Kraft (auch der Schwerkraft) zu fließen. Ohne Krafteinfluß kommt es zum Stillstand, es erfolgt keine Rückkehr in den ursprünglichen Zustand. Die Viskosität erhält man nun, indem man das Verhältnis der Scherkraft zur Deformationsänderungsgeschwindigkeit untersucht. Die Viskosität (n) ergibt sich aus der Beziehung $n = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$, σ = Scherkraft, $\dot{\gamma}$ = Schergefälle (41). Die Einheit der Viskosität lautet Pa's. Die Rheogramme Nicht-Newtonscher Systeme - und hierunter fallen die meisten Pharmaka bzw. Emulsionen -, bei denen also das Verhältnis Scherkraft/Schergefälle nicht konstant ist, sind kompliziert. Als Meßinstrument eignet sich in diesem Falle ein Rotationsviskosimeter.

Für die Viskositätsuntersuchungen[1] dieser Arbeit wurde ein Rotationsviskosimeter der Fa. Brookfield nach dem Kegel-Platte-Prinzip verwendet (Abb. 10). Zur Messung wird hier eine bestimmte Probenmenge zentral in einen thermostatierten Meßbecher mit planem Boden gebracht. Dieser Behälter wird jetzt an den rotierenden Kegel angebracht, so daß der Kegel gerade eben auf der Platte aufsitzt. Der Kegel wird durch einen Motor mit variablen Geschwindigkeiten angetrieben. Dabei kommt es zur

[1] Die Viskositätsuntersuchungen erfolgten in der Universitätsapotheke Tübingen.

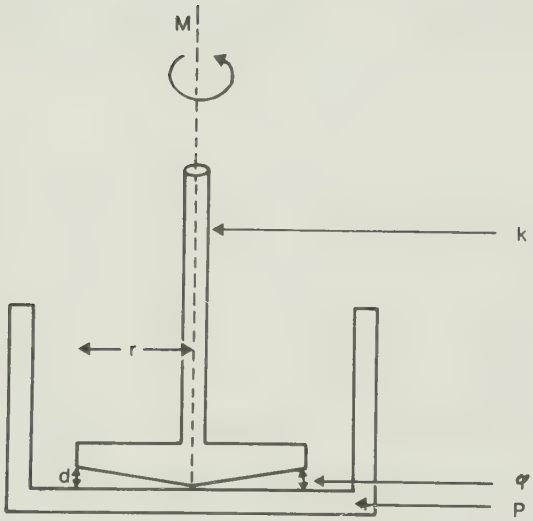


Abb.10: Rotationsviskosimeter nach dem Kegel-Platte-Prinzip

φ : Öffnungswinkel

d: Höhe

r: Radius

M: Motor

P: Stationäre Platte

Scherung der Untersuchungsprobe im engen Spalt zwischen Platte und rotierendem Kegel. Die Scherkraft steht nun mit der Umdrehungsgeschwindigkeit des Kegels in einem bestimmten Verhältnis und kann als Drehmoment auf einer Geräteskala abgelesen werden. Mit einer gerätespezifischen Konstanten konnte nun der Skalenwert unter Berücksichtigung der jeweils anliegenden Umdrehungsgeschwindigkeit in einem rheologischen Wert (dynamische Viskosität) umgerechnet werden.

5. Technisches Vorgehen zur Durchführung der direkten Chromolymphographie beim Kaninchen

Die vorgenannten Substanzen wurden an Kaninchen (große weiße Riesen) untersucht. Die Zuchtbedingungen basierten auf anerkannten Standards (17, 31, 70). Diese Kaninchenrasse ist wegen ihrer Größe zur Lymphographie besonders geeignet. Die Zahl der in den verschiedenen Gruppen verwandten Tiere ist in der Tabelle 1 aufgelistet.

5.1. Narkose

Zur Prämedikation des Kaninchens wurde zunächst eine Ampulle Megaphen^{R} in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Nach ca. 30 Minuten ist die Wirkung zu erwarten. Als nächstes wurde eine Ohrvene mit einem Mikrocath (B. Braun, Melsungen) kanuliert. Nach Fixation des Mikrocaths wurden 50 mg Ketanest^{R} und 0,5 Rompun^{R} injiziert. Zur Unterhaltung der Narkose wurden alle 30 - 40 Minuten ca. 1 ml des 25 %igen Chloralhydrat gegeben. Nach jeder Chloralhydratinjektion wurde die Kanüle mit physiologisch - Kochsalzlösung durchgespült. Diese Narkoseart wurde auch in der Literatur erwähnt (43).

5.2. Technik der experimentellen Lymphangiographie

Die Injektion des Farbstoffpräparates erfolgte in einen poplitealen Lymphknoten eines Hinterlaufes. Die anatomischen Grundlagen sind aus der Literatur bekannt (47). Dazu wurde der entsprechende Hinterlauf rasiert und desinfiziert. Zur Präparation des Lymphknotens wurde das Kaninchen in Rückenlagerung gebracht und so fixiert. Bei Kaninchen, deren Lymphknoten nicht deutlich tastbar waren, wurden zur besseren Lokalisierung des Lymphknotens interdigital 0,5 ml 2,5 %iges Patentblau V injiziert. Durch Bewegung des Fußes erreichte man eine

Farbstoffpräparat		Versuchstiere n =
Guajazulen	20 %	
Lipiodol	80 %	5
Guajazulen	10 %	
Lecithin	10 %	4
Alkohol 70 %ig	10 %	
Aqua dest.	70 %	
Guajazulen	20 %	
Tween 20	40 %	3
Aqua dest.	40 %	
Guajazulen	10 %	
Tween 80	90 %	3
Leere Liposomen		2
Liposomen		
Patentblau 81 mg/ml		9
Gesamtzahl		26

Tab.1: Tierexperimentelle Details zur Anwendung der verschiedenen Farbstoffpräparate.

rasche Farbverteilung und Anfärbung des Lymphsystems. Nach etwa 5 Minuten erfolgte ein Hautschnitt über den poplitealen Lymphknoten auf einer Strecke von ca. 4 cm. Danach wurde der Lymphknoten herausluxiert und mit einer feinen Präparierschere vom umliegenden Fettgewebe freipräpariert. Jetzt wurde der Lymphknoten mit einer Butterfly-R-25-short-Kanüle (Firma Abbott, Irland) angestochen. Die Kanüle wurde mit einer Tabaksbeutelnaht 6-0 in der Lymphknotenkapsel fixiert. Zusätzlich wurde die Kanüle mit Histoacryl an der Haut befestigt (Abb. 11). Mit einem Perfusor[1] wurde bei einer Geschwindigkeit von 4 ml/Stunde zunächst ein wässriges Kontrastmittel (Endographin^{R}) zur Kontrolle der regelrechten Lage der Nadel und zur Durchgängigkeitskontrolle der Lymphwege injiziert. Es wurden ca. 0,5 ml des Kontrastmittels verwendet. Bei röntgenologisch festgestellter regelrechter Lage der Nadel und guter Darstellung der Lymphwege konnte mit der Chromolymphographie begonnen werden (Abb. 12). Die Menge des Farbstoffpräparates richtete sich nach dem Gewicht des Kaninchens, wobei 0,3 mg/kg Körpergewicht verwendet wurden. Nach der Infusion erfolgte der Verschluß. Nach Versuchsende wurden die Kaninchen mit i.v.-Injektionen von T^{R} 61 getötet.

[1] B. Braun Melsungen AG

Abb.11: Punktionstechnik. Der popliteale LK ist freigelegt. Punktion mit der Butterfly-R-25-short-Kanüle.

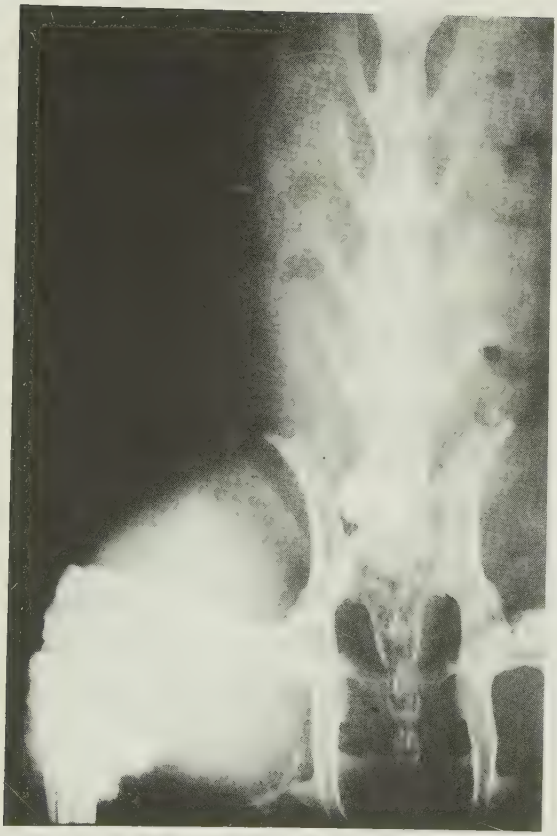


Abb.12: Röntgenbefund 48 Stunden nach endolymphatischer Kontrastmittelinfusion rechts.

6. Durchführung der histologischen Untersuchungen:

Nach Versuchsende wurden die einzelnen Organe (Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz) sowie popliteale und retroperitoneale Lymphknoten für die histologische Beurteilung aufgearbeitet. Dazu wurden kleine Gewebsstücke in 4 %igem Formalin fixiert. Als Färbungsmethode wurde die Hämatoxilin-Eosin (H-E) verwendet. Analoge Organteile wurden auch für die Konzentrationsbestimmung vorbereitet (vgl. 1.1.1 und 1.2.1).

III. ERGEBNISSE

1. Qualitätsprüfung der Zubereitungen

1.1. Stabilität

Sämtliche Präparationen wurden nach der Herstellung über 30 Tage bei Zimmertemperatur und bei 4 ^{o} C gelagert. Anschließend wurden sie 10 Minuten bei 2000 UPM zentrifugiert. Alle Präparationen blieben nach dieser Prüfung stabil.

Dieses Programm der Stabilitätsprüfung hat sich bei einigen Vorversuchen als ausreichend bestätigt.

1.2. Homogenität

Sämtliche Präparationen wurden auf Homogenität untersucht. Die Emulsionen und Lösungen wurden im Lichtmikroskop, die Liposomen im Elektronenmikroskop betrachtet. Die Präparationen erwiesen sich als homogen. Anschließend wurden sie durch eine 27-G-Nadel gepreßt, um die Gefahr der Nadelverstopfung im Tierversuch zu vermeiden. Diese Prüfung hat nur Guajazulen-Tween^{R} 80 nicht bestanden. Bei 15^{o} C kam es zur Verstopfung der Nadel, bei 37^{o} C war ein außerordentlich hoher Druck erforderlich.

1.3. Sterilität

Sämtliche Präparationen wurden unter sterilen Bedingungen unter Laminar Flow hergestellt. Die Sterilitätsprüfung wurde mit herkömmlichen bakteriellen Nährböden im mikrobiologischen Labor[1] durchgeführt.

In einigen Präparationen wurden trotz sorgfältiger Herstellung Bakterien und Pilze gezüchtet.

[1] Die Sterilitätsprüfungen wurden im Labor von P.D. Dr. Schweinsberg durchgeführt.

1.4. Viskosität

Die Viskosität der Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung war niedriger als die Viskosität von Lipiodol selbst. Sie war stark temperaturabhängig, hat aber den Wert von 30 mPa · s nicht überschritten. Das Verhalten der Viskosität in Abhängigkeit von Temperatur und Belastung ist auf Abb. 13 zu sehen.

Die Viskosität von Guajazulen-Lecithin war sehr niedrig und nicht temperaturabhängig. (vgl. Abb. 14). Sie lag unter 5 mPa · s.

Die Viskosität von Guajazulen-Tween^{R}-Präparationen war höher als die Viskosität aller sonstiger Zubereitungen. Sie war stark temperaturabhängig und war bei 15 ^{o} C um mehr als den Faktor 2 höher als bei 37^{o} C. Die Viskosität von Guajazulen-Tween^{R} 20-Emulsionen war ausreichend niedrig (bis ca. 50 mPa · s, vgl. Abb.15).

Die Guajazulen-Tween^{R} 80-Lösung war wegen ihrer sehr hohen Viskosität (bis 300 mPa · s, vgl. Abb. 16) ungünstiger als die Guajazulen-Tween^{R} 20-Emulsion.

Die Viskosität von Patentblau-Liposomen war die niedrigste aller Zubereitungen (max. 1,5 mPa · s, vgl. Abb. 17).

Die Viskositätsmessungen ergaben, daß bei den Patentblau-Liposomen, ferner auch bei der Guajazulen-Lecithin-Emulsion die besten Injektionsbedingungen zu erwarten sind.

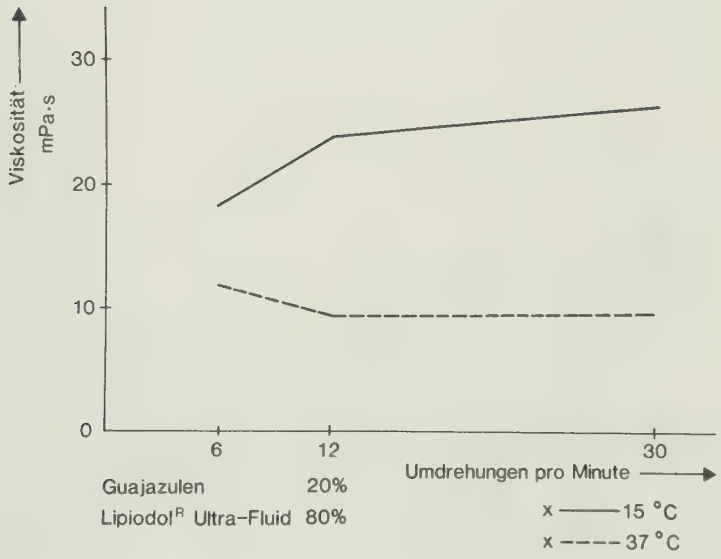


Abb.13: Viskosität der Guajazulen-Lipiodol^{R}-Zubereitung.

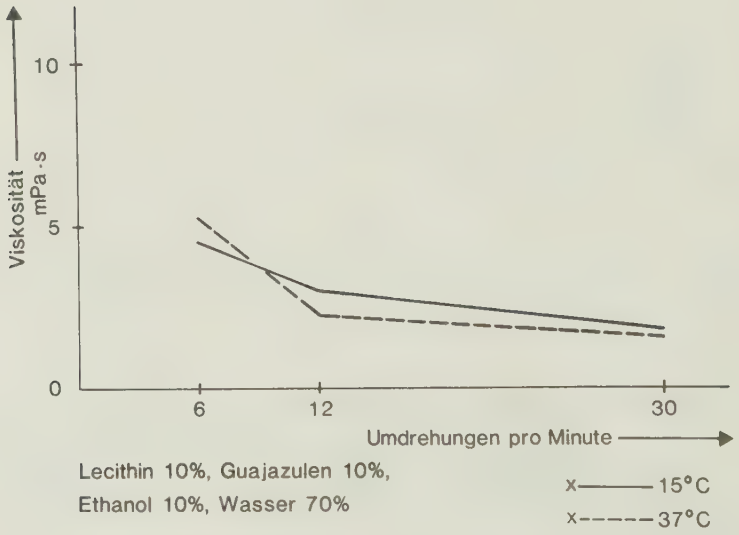


Abb.14: Viskosität der Guajazulen-Lecithin-Emulsion.

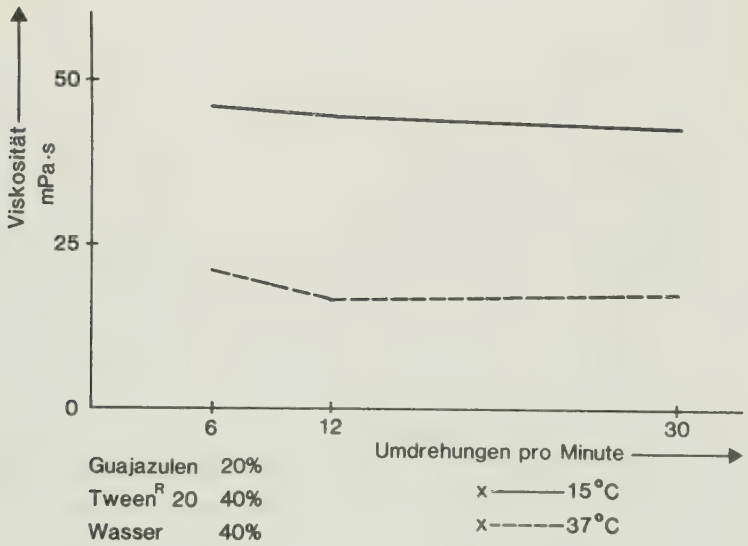


Abb.15: Viskosität der Guajazulen-Tween®-20-Emulsion.
Hohe Temperaturabhängigkeit.

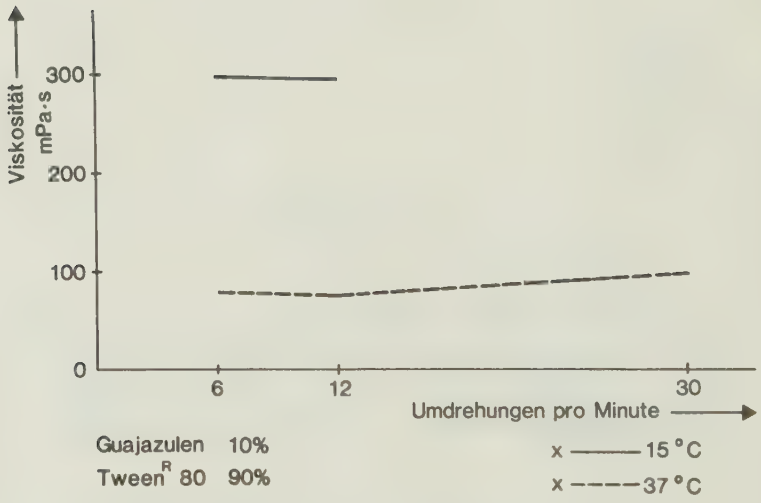


Abb.16: Guajazulen-Tween^{R} 80-Lösung:
Sehr hohe Viskosität, hohe Temperaturabhängigkeit.

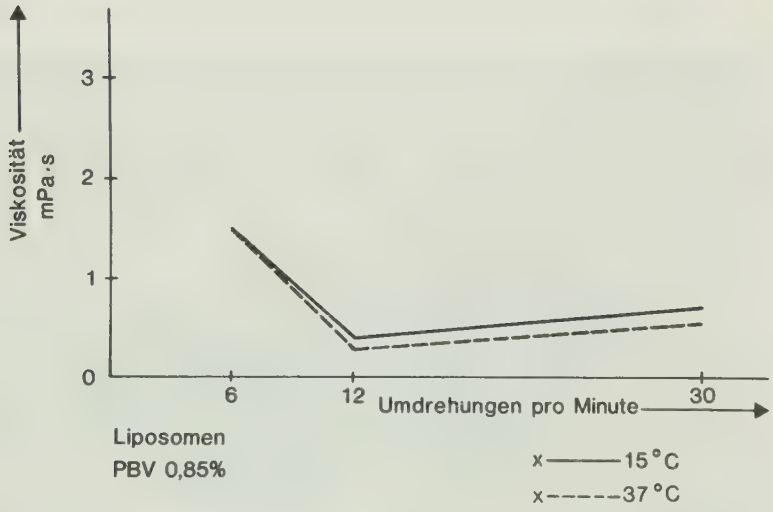


Abb.17: Viskosität der Patentblau-Liposomen-Präparation.

2. In-Vivo-Verhalten der Zubereitungen

2.1. Die Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung

Die Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung wurde 5 Kaninchen injiziert. Die Färbung der retroperitonealen Lymphknoten blieb mehrere Tage nach der Injektion bestehen. Bei den nach 7 Tagen untersuchten Kaninchen waren die Lymphknoten unverändert tiefblau (Abb. 18).

Es fanden sich jedoch histologisch eindeutige Veränderungen. Unmittelbar nach der Injektion war das Lymphknotenparenchym erheblich aufgelockert, die Sinusoide erweitert. Einen Tag nach der Injektion fanden sich felderartige Nekrosen mit fibrinösen Randzonen.

Zwei Tage nach der Injektion wurde eine Zunahme der Nekrosen festgestellt, in einigen Lymphknoten waren nur in Randzonen lymphozytäre Zellelemente erhalten.

7 Tage nach der Injektion fand man kleinherdige Nekrose (Abb. 19).

Am Rande der riesigen Öltropfen (Abb. 20) fand man histozytäre Riesenzellen. Am 17. Tag nach der Injektion waren die Öltropfen kaum auffindbar. Die Nekrosen (Abb. 21) waren nachweisbar. Es trat vermehrt Fibrinisierung des Gewebes auf.

Zusammenfassend war die Gewebsschädigung durch diese Lösung zwar ausgeprägt, jedoch reversibel mit guter Heilungstendenz und Ausbildung von Vernarbungen.

Die Verteilung einer 20 %igen Guajazulenlösung in Lipiodol in verschiedenen Organen der Kaninchen (n = 5) nach intralymphatischer Applikation (rechter Hinterlauf, popliteral) von 0,3 ml Guajazulenlösung/kg Körpergewicht ist auf der Tabelle 2 dargestellt.

Abb.18: Lymphknotenpräparat nach Guajazulen-Lipiodol^{R}-Chromolymphographie: die punktförmige Anfärbung ist deutlich zu erkennen.

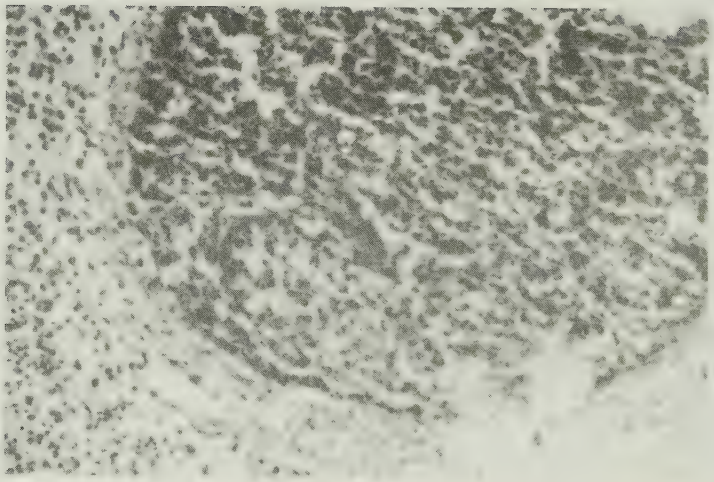


Abb.19: Retroperitonealer Lymphknoten 7 Tage nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung. Nekroseherd.

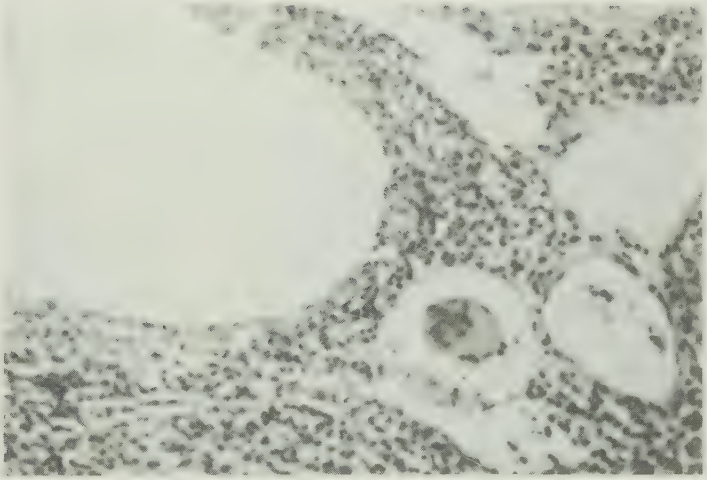


Abb.20: Retroperitonealer Lymphknoten 7 Tage nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung. Histozytäre Riesenzellen mit Epithelzellen. Komprimierung des Lymphgewebes durch den riesigen Öltropfen.

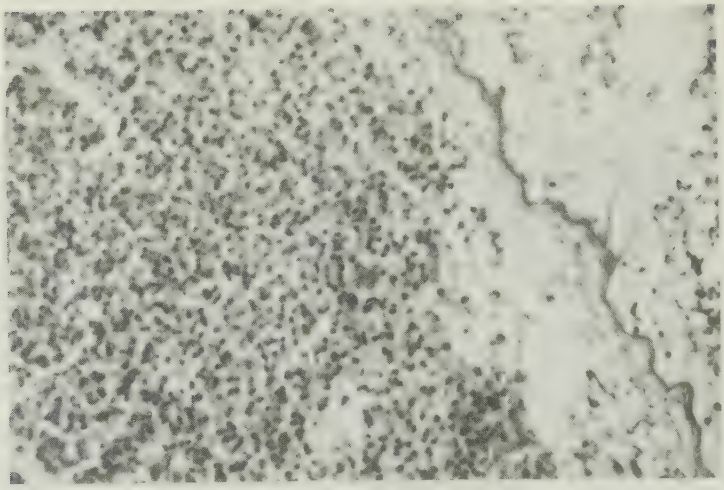


Abb.27: Retroperitonealer Lymphknoten 1 Tag nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Tween^{R} 80-Zubereitung. Ausgedehnte frische Nekrose.

2.2. Guajazulen-Lecithin-Emulsion

Die Färbung der retroperitonealen Lymphknoten war über mehrere Tage unverändert intensiv. Nach 24 Stunden waren die LK tiefblau gefärbt, zeigten keine Nekrosen, jedoch eine deutliche Volumenzunahme (Abb. 22). Nach 3 und nach 4 Tagen waren bereits makroskopisch sichtbare Nekrosen feststellbar. In den poplitealen Lymphknoten zeigte sich um das Farbstoffdepot ein Nekrosebezirk (Abb. 23, 24). Die tiefblau gefärbten und erweiterten Lymphgefäße ließen erkennen, daß es durch die Speicherung der Emulsion zur Behinderung des Lymphabflusses gekommen war. Entlang der Gefäßwand fanden sich herdförmige Gewebenekrosen (Abb. 25).
4 Tage nach der Injektion fanden sich lymphoplasmazelluläre Infiltrate mit herdförmig granulozytärer Komponente sowie ausgeprägte follikuläre Hyperplasien mit Ausbildung von Sekundärfollikeln und großen Reaktionszentren.

2.3. Guajazulen-Tween^{R}-Präparationen

Beide Präparationen (sowohl die mit Tween^{R} 20 als auch solche mit Tween^{R} 80) wurden in den Lymphknoten über mehrere Tage gespeichert (s. Abb. 26). Eine homogene Anfärbung der Lymphknoten wurde nicht beobachtet, stattdessen jedoch umschriebene herdförmige Einlagerungen des Farbstoffes. Dort waren ausgeprägte Nekrosen feststellbar (Abb. 27). Beide Präparationen, vorwiegend aber diejenige mit Tween^{R} 80, erwiesen sich für die Lymphknotenfärbung wegen der hohen Viskosität und der Ausbildung von Nekrosen als ungeeignet.

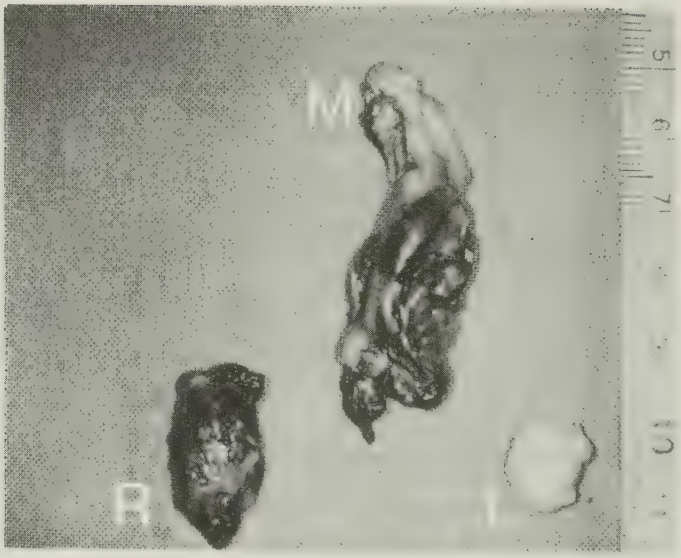


Abb.22: Lymphknoten des Kaninchens 24 Stunden nach rechtsseitiger endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Lecithin-Emulsion:
R = poplitealer Lymphknoten rechts
L = poplitealer Lymphknoten links
M = retroperitoneale Lymphknoten
Die Volumendifferenz zwischen gefärbtem und ungefärbtem Lymphknoten ist deutlich zu erkennen.

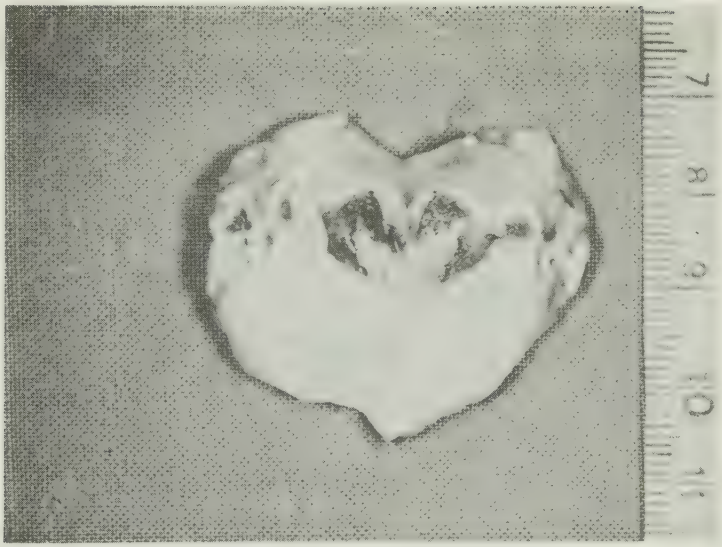


Abb.23: Poplitealer Lymphknoten 4 Tage nach Injektion der Guajazulen-Lecithin-Zubereitung. Nekrosen umgeben das Farbstoffdepot.

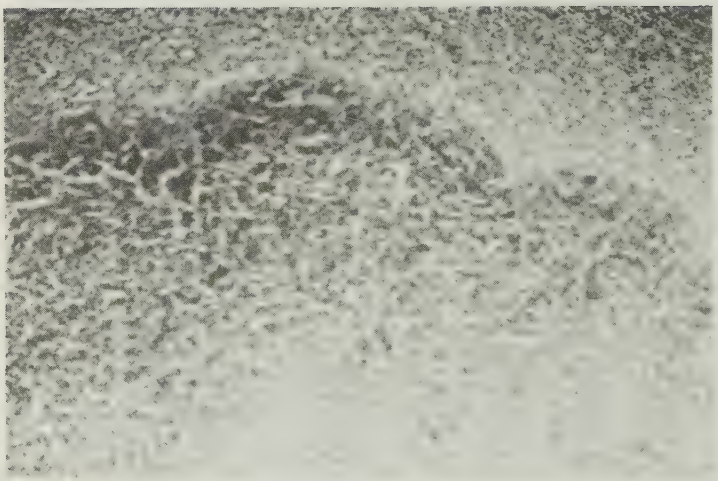


Abb.24: Poplitealer Lymphknoten 4 Tage nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Lecithin-Emulsion. Ausgedehnter Nekrosebezirk.

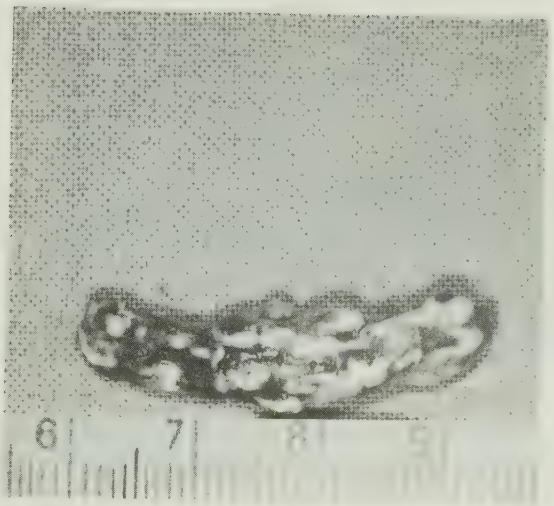


Abb.25: Lymphgefäße mit umgebendem Gewebe 4 Tage nach endolymphatischer Injektion der Guajazulen-Lecithin-Emulsion. Die tiefblau gefärbten Lymphgefäße zeigen stellenweise Nekroseherde.

GUAJAZULEN

Organ	µg/g Homogenisat		µg/Organ	
	1. Tag	7. Tag	1. Tag	7. Tag
Leber	1,2	0,6	220	100
Lunge	5,3	1,0	170	31
Herz	5,8	0,7	87	13
Niere	1,2	0,55	52	18

Tab.2

Verteilung von Guajazulen in verschiedenen Organen nach endolymphatischer Injektion von 2 ml einer 2o %-igen Guajazulenlösung in Lipiodol bei Kaninchen nach 1 Tag (n = 2) und nach 7 Tagen (n = 3).

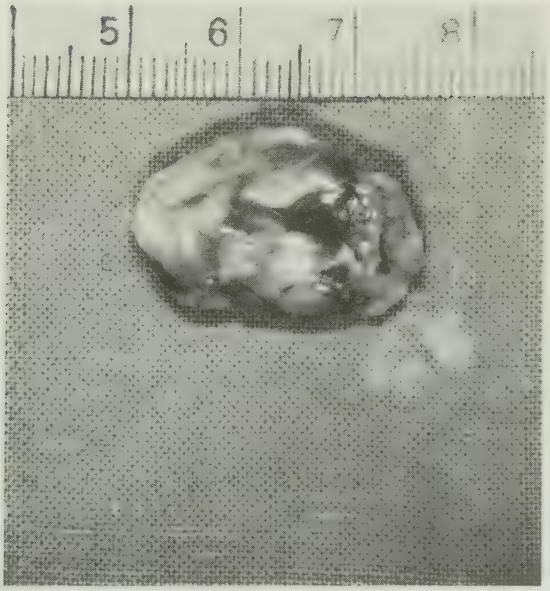


Abb.26: Poplitealer Lymphknoten 7 Tage nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Tween^{R} 80-Lösung: Herdförmige Einlagerung des Farbstoffes.

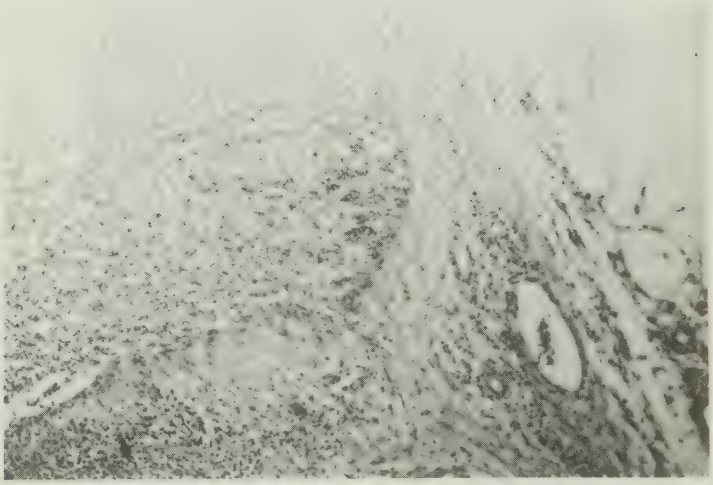


Abb.21: Retroperitonealer Lymphknoten 17 Tage nach endolymphatischer Injektion von Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung. Keine Öltropfen mehr. Nekrosebezirke. Zelldetritus mit Granulozyte.

2.4. Patentblau-Liposomen

Die im Vorversuch als Kontrolle injizierten "leeren" Liposomen führten nicht zur Veränderung der Lymphknotenstruktur. Nach 4 Wochen waren die so behandelten Lymphknoten weder vergrößert noch histologisch auffällig.

Die intensive Färbung der Lymphknoten 2 Tage nach der Injektion von 1,6 % Patentblau-Liposomen wird auf den Abbildungen 28 und 29 demonstriert.

Die Experimente zeigten, daß für eine mehrere Wochen anhaltende Färbung eine 0,8 %ige Präparation ausreichend ist (Abb. 30 und 31).

Histologisch fanden sich keine Nebenwirkungen der Liposomen-Lymphographie (Abb. 32). Stellenweise fand man erweiterte Sinusoide (Abb.33).

Einen Tag nach der Injektion lag die Patentblau-Konzentration in den politealen Lymphknoten bei 769 µg/g Gewebe. Im Laufe des Experimentes kam es zur Senkung dieser Konzentration bis auf einen Wert von 155 µg/g Gewebe nach Ablauf von 4 Wochen. Die Konzentration in den retroperitonealen Lymphknoten betrug zu diesem Zeitpunkt 189 µg/g Gewebe. Diese Konzentrationen erwiesen sich als völlig ausreichend, um eine tiefblaue Färbung zu erzielen.

In sonstigen Gewebsproben (Lunge, Leber, Milz, Niere, Blut) waren die Patentblau-Konzentrationen nicht meßbar oder lagen unter 5 µg/g Gewebe.

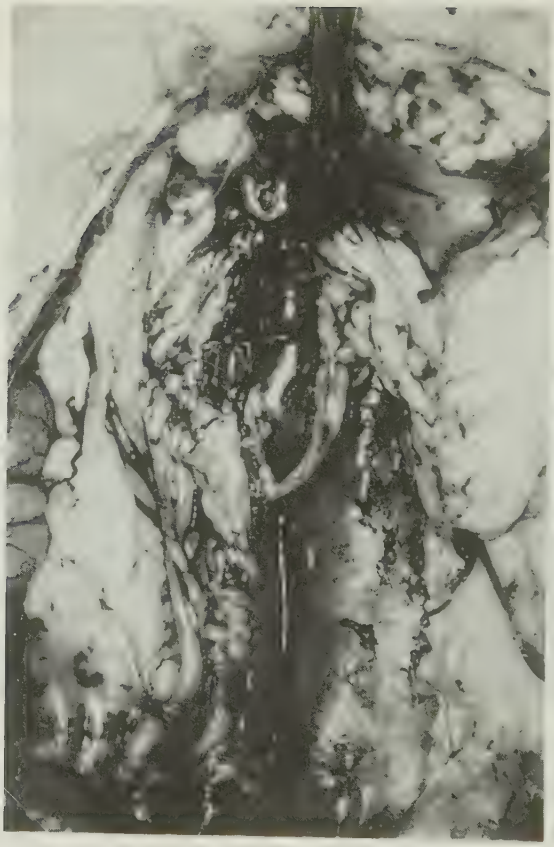
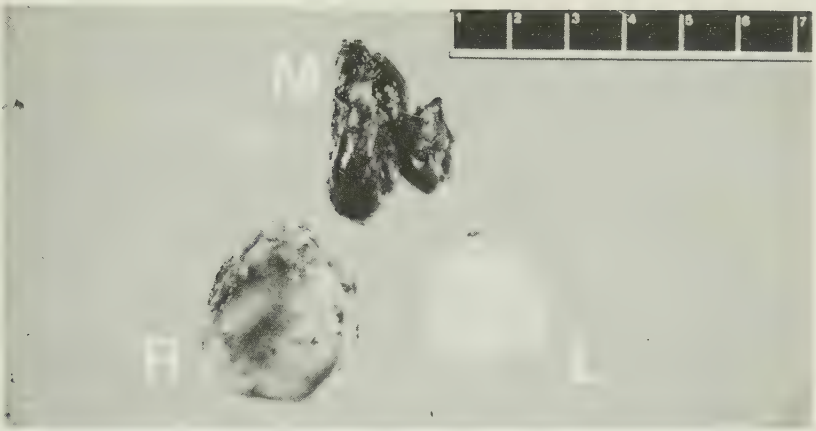
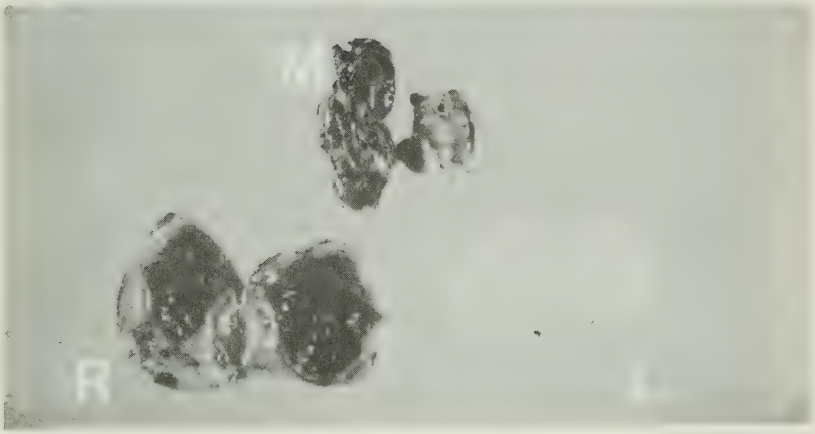


Abb.28: Tiefblau gefärbte retroperitoneale Lymphknoten des Kaninchens 2 Tage nach endolymphatischer Injektion von Patentblau-Liposomen.
Man beachte den deutlichen Kontrast zum umgebenden Gewebe.



A



B

Abb.29: Lymphknoten des Kaninchens 2 Tage nach rechtsseitiger endolymphatischer Injektion von Patentblau-Liposomen.
R = poplitealer Lymphknoten rechts
L = poplitealer Lymphknoten links
M = retroperitoneale Lymphknoten
A: Lymphknoten freipräpariert
B: Lymphknoten freipräpariert und aufgeschnitten

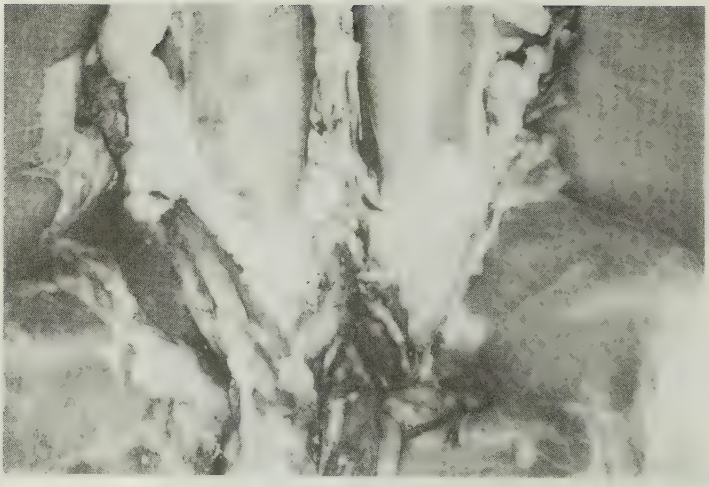


Abb.30: Intraoperativer Experimentalbefund:
Tiefblau gefärbte Lymphknoten und Lympgefäße in Situ 28 Tage nach endolymphatischer Injektion von Patentblau-Liposomen beim Kaninchen.

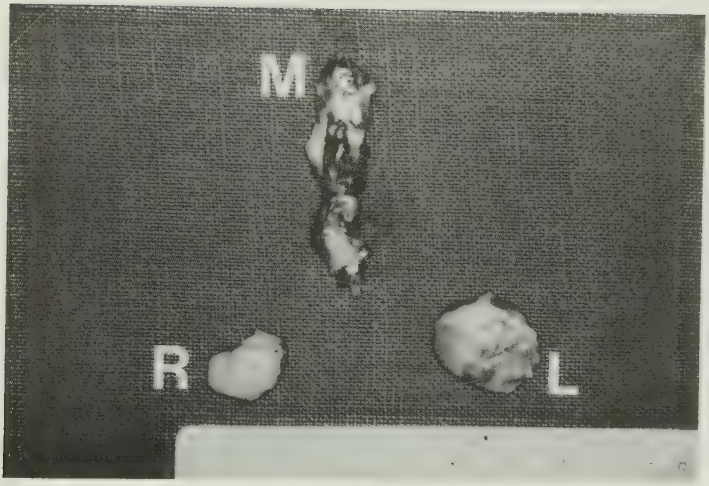


Abb.31: Lymphknoten des Kaninchens 28 Tage nach Injektion von Patentblau-Liposomen links (vgl. Abb.28)
R = popliteraler Lymphknoten rechts
L = popliteraler Lymphknoten links
M = retroperitonealer Lymphknoten

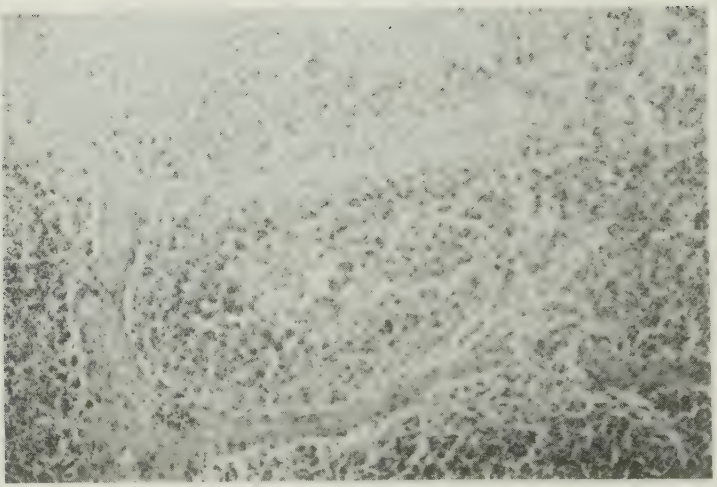


Abb.32: Retroperitonealer Lymphknoten 28 Tage nach endolymphatischer Injektion von Patentblau-Liposomen. Unauffälliges Gewebe.

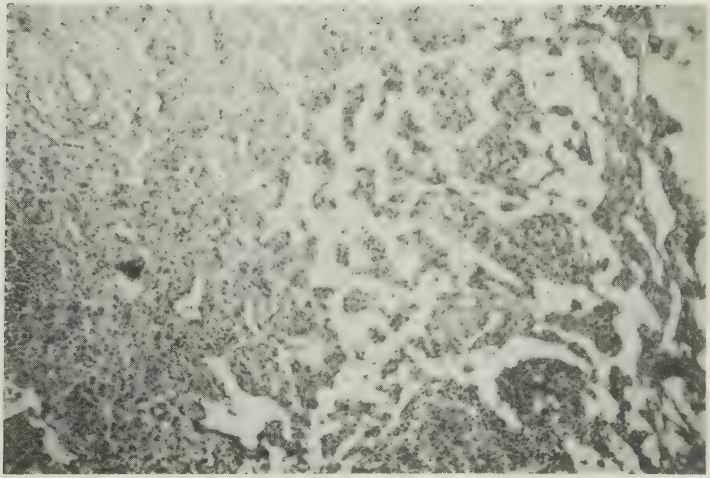


Abb.33: Retroperitonealer Lymphknoten 28 Tage nach endolymphatischer Injektion von Patentblau-Liposomen. Bis auf erweiterte Sinusherde keine Schädigung des Parenchyms. Geringe lymphozytäre Rarifizierung.

IV. DISKUSSION

Die Lymphographie ist als diagnostische Routinemethode bereits seit über 3 Jahrzehnten bekannt (20, 29). Diese röntgenologische Darstellung der retroperitonealen Lymphknoten informiert unter anderem über die Ausdehnung maligner Prozesse (19). Die Lymphographie hat bis heute einen diagnostischen Informationswert, der durch die später eingeführten Techniken Ultraschall und CT nicht wesentlich übertroffen werden konnte(9). Zugleich liefert die Feststellung einer lymphatischen Metastasierung wesentliche Hinweise zur Prognose oder dient als Entscheidungshilfe bei der Wahl der weiteren Therapie, wie dies im Bereich der Urologie vor allem für das Hodenkarzinom gilt (4). Dieses diagnostische Verfahren hat allerdings Nachteile.

Nach Lipiodol^{R}-Lymphographie kommt es zu morphologischen Veränderungen im Lymphknoten (11, 16, 57). Die überschüssige Menge des injizierten Kontrastmittels kann zu Kontrastmittelembolien führen (14). Die Methode ist zeitintensiv und fordert viel Erfahrung im Umgang mit zarten Lymphgefäßen. Deshalb haben verschiedene Autoren (5, 18, 53) erfolgreich versucht, die Lymphknoten direkt zu kanülieren.

Ein weiterer Nachteil ist, daß durch die klassische Fußrückenlymphographie nicht alle Lymphknoten erfaßt werden. Um diesen Nachteil zu vermeiden, hat man z. B. beim Hodenkarzinom versucht, eine verbesserte Darstellung durch gleichzeitige Fuß- und Samenstrang-Hodenlymphographie zu erreichen (7). Auch Techniken der Kanülierung der Lymphgefäße von Niere, Hoden und Herz (6) sowie der Prostata (55, 56) wurden beschrieben. Um die oben erwähnten technischen Probleme zu vermeiden, wurde versucht, ein Kontrastmittel zu entwickeln, das aus dem damit behandelten Gewebe in Lymphgefäße übertritt und so die Darstellung des Lymphsystems ermöglicht. Einige Arbeiten mit anfänglich viel ver-

sprechenden Mitteln, wie z. B. Iotasul^{R} (2, 64), haben diese Erwartung nicht erfüllt. Auch eine indirekte Lymphographie der Harnblase (20) kam über die Phase der Tierversuche nicht hinaus.

Die oben skizzierten Probleme gehören zur Basisinformation im Rahmen von Versuchen, die Anwendung der Lymphographie zu erweitern. Da diese Methode vorwiegend präoperativ eingesetzt wird, hat man versucht, außer der Röntgendarstellung auch eine optische kontrollierbare, intraoperative Färbung von Lymphknoten zu erzielen. Diese Methode ist unter dem Begriff "Chromolymphographie" bekannt.

Die klinische Bedeutung einer solchen Technik kann am Beispiel der urologischen Onkologie verdeutlich werden. Derzeit wird versucht, durch eine modifizierte Lymphadenektomie beim Hodenkarzinom (25) postoperative Ejakulationsstörungen weitgehend zu vermeiden (69).
Die Chromolymphographie wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Substanzen vorgeschlagen (12, 17, 35, 36, 42, 52, 59, 60, 62, 63, 65, 71). Die Analyse der Literatur zeigt, daß bisher kein zuverlässiges Chromolymphographiesystem - abgesehen von der Guajazulen-Technik - existiert. Die Chromolymphographie hat sich bisher als Routinemethode nicht etablieren können. Unzureichende Kontrastierung und Toxizität waren die Hauptursachen.

Die Verwendung des Wirkstoffes der Kamille, des Guajazulens (24), hat die Chromolymphographie-Forschung wieder intensiviert. Die Anwendbarkeit dieser Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung wurde bereits klinisch bestätigt (3). Die Präparation verhält sich in vivo ähnlich wie Lipiodol, allerdings bei den bekannten Nachteilen der klassischen Lymphographie. Vor allem die pulmonale Belastung durch überschüssiges Öl kann intraoperativ zu gra-

vierenden respiratorischen Störungen führen.

In dieser Arbeit wurde daher eine Dosierung von 0,3 ml/kg Körpergewicht strikt eingehalten. Diese Dosis stimmt mit der in der Literatur (6) empfohlenen Dosierungen überein. Es wurde dabei erwartet, daß bei ausreichender Kontrastmittel-Anschoppung der Lymphknoten kein massiver Übertritt des Kontrastmittels über den Ductus thoracicus zustande kommt.

Die Mindestmenge der endolymphatisch injizierten Flüssigkeit wurde bei erwachsenen Menschen mit 3,5 ml pro Seite ermittelt (51). Dieser Wert wurde für endolymphatische Therapie mit Radionukliden bestimmt, um die Strahlenbelastung der Lunge zu minimalisieren. Bei Nichtbeachtung dieser Regel kommt es zum bedeutsamen Übertritt der Radionuklide in die Lunge (38).

Die Geschwindigkeit der Injektion wurde in dieser Arbeit niedrig gehalten, um die physiologische Geschwindigkeit der Lymphbewegung möglichst wenig zu stören. Die Menge von durchschnittlich 2 ml der Präparation wurde pro Kaninchen in 30 Minuten injiziert. Dieser Wert stimmt mit dem in der Literatur angegebenen (2, 26, 39) überein. Die genauen Messungen (67) ergaben, daß bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. ein intralymphatischer Druck in Höhe von 16 mmHg erreicht wird und die Gefäßwände dabei noch nicht rupturieren. Diese hohe Geschwindigkeit ist jedoch allein aus Gründen der Schonung des Lymphknotengewebes nicht empfehlenswert.

Bei der gewählten Menge und Geschwindigkeit wurde bei keinem Kaninchen eine Lungenembolie oder Ruptur der Lymphgefäße beobachtet.

Die verschiedenen in dieser Arbeit geprüften Präparationen haben sich im Tierversuch unterschiedlich verhalten.

Die Anwendung der 20 %igen Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung hatte ähnliche Ergebnisse wie die in der Literatur bereits beschriebenen Untersuchungen (21, 24). Übereinstimmend konnte vor allem die anhaltend gute Anfärbung der Lymphknoten festgestellt werden. Die vorliegende Untersuchung wies jedoch gehäuft Lymphknotennekrosen mit nachfolgender Fibrosierung nach.

Für die Zwecke der intraoperativen Lymphknotenvitalfärbung können Nekrosen durchaus akzeptiert werden, weil der Großteil der betroffenen Lymphknoten eben durch die Färbung identifiziert und entfernt wird. Die weitgehenden, durch den Farbstoff bedingten Gewebsveränderungen führen aber zur deutlichen Erschwerung der histologischen Beurteilung, so daß die Aussagesicherheit bei beginnender Metastasierung möglicherweise eingeschränkt wird.

Ein Versuch, das Öl aus der Präparation zu eliminieren, hat im Falle von Guajazulen-Lecithin-Emulsionen gewisse Erfolge gezeigt. Bei guter Färbung der Lymphknoten haben jedoch die ausgeprägten Gefäßwandnekrosen und lymphoplasmazelluläre Infiltrate den Wert dieser Präparation gemindert. Immerhin war Lecithin ein besserer Emulgator als Tweens. Die hohe Viskosität, vor allem von Tween^{R} 80, hat zu einer erheblich erschwerten und unvollständigen Füllung der Lymphknoten geführt. Aus diesem Grund kam es zu Rupturen der Lymphknotenkapseln. Die eindeutige Gewebsunverträglichkeit machte diese Präparationen letztlich für weitere Studien ungeeignet.

Die besten Ergebnisse wurden mit einem ganz neuen Farbstoff-Trägersystem - den Liposomen - erzielt. Sie sind zwar als Träger

verschiedener Wirkstoffe bekannt (50), wurden aber erst jetzt für die Zwecke der Chromolymphographie verwandt (27). Die hohe Qualität dieser Liposomen wurde durch den Einsatz eines speziellen Gerätes (Liposomat, Dianorm München) gewährleistet. Homogenität, Stabilität, Viskosität und Einschlußkapazität entsprachen allen Forderungen in ein für die Chromolymphographie geeignetes Trägersystem. Die Technik der Liposomenherstellung wurde bereits publiziert (40).

Hier wurde zunächst die Gewebsverträglichkeit von nichtbeladenen Liposomen geprüft. 4 Wochen nach endolymphatischer Injektion dieser Liposomen fanden sich keinerlei Zeichen einer Lymphknotenschädigung, und zwar weder mikro- noch makroskopisch. Es ist davon auszugehen, daß die aus Naturlipiden aufgebauten Liposomen infolge ihrer vollen Bioverfügbarkeit restlos abgebaut werden. Die mit Patentblau V gefüllten Liposomen verhielten sich ähnlich. Nennenswerte Schädigungen der Lymphknoten waren nicht feststellbar. Das Patentblau V selbst hat völlig neue Eigenschaften gezeigt. Diese Substanz, die bis jetzt nur für die kurzfristige Färbung von Lymphgefäßen verwandt wurde, folgte nach ihrer Verkapselung der Pharmakokinetik der Liposomen. Es resultierte der überraschende Befund, daß Patentblau noch nach 4 Wochen in hohen Konzentrationen in Lymphknoten feststellbar ist.

Zusammenfassend konnte die Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung als im wesentlichen für die Chromolymphographie geeignetes Präparat bestätigt werden. Die sonstigen Guajazulen-Präparationen haben keine überzeugenden Vorteile demonstriert. Die Verwendung von Liposomen dürfte allerdings die Grundlage für verbesserte Chromolymphographie-Präparate bilden. Die künftige Entwicklung zur Herstellung der für die klinische Routine einsetzbaren Chromolymphographiesubstanzen liegt wahrscheinlich im Bereich der Liposomenforschung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die präoperative Chromolymphographie ist eine entscheidende Hilfe für die Lymphadenektomie, weil sie auf dem Weg über die intraoperative Vitalfärbung der Lymphknoten dessen selektive Entfernung bei weitgehender Schonung des umliegenden Gewebes ermöglicht.

Diese Methode hat bisher keine breite klinische Anwendung gefunden, weil die Qualität der verwandten Farbstoffe unzureichend war.

Es wurde hier versucht, den für die Chromolymphographie kürzlich entwickelten Farbstoff Guajazulen in verschiedenen Zubereitungen bei Kaninchen endolymphatisch zu applizieren. Verglichen wurden drei Präparationen:

1. Guajazulen-Lipiodol^{R}-Lösung,
2. Guajazulen-Lecithin-Emulsion,
3. Guajazulen-Tween^{R}-Präparationen.

Es zeigte sich, daß die Präparationen 1 und 2 ähnliche Eigenschaften haben. Bei geringer Toxizität resultierte bei beiden eine deutliche Anfärbung der Lymphknoten. Die Präparationen 3 waren wegen hoher Viskosität und Toxizität nicht erfolgreich.

Die besten Eigenschaften zeigte allerdings eine Zubereitung, in der Liposomen als Farbstoffträger benutzt wurden. Tierexperimentelle Anwendungen ergaben bei denkbar geringer Toxizität eine optimale Anfärbung der Lymphknoten durch die mit Patentblau beladenen Liposomen. Die Befunde sprechen dafür, diese Technik auch für die klinische Chromolymphographie zu empfehlen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ames, B.N., McCann, J., Yamasakii, E. (1975)
Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutogenicity test.
Mutat. Res. 31, 347-364

2. Apitzch, D.E., Kroll, J.U., Zühlke, H.V. (1981)
Indirect caudal lymphography using a new water-soluble contrast-agent - animal experimental studies in pigs.
Lymphology 14, 95

3. Bausch, M. (1985)
Untersuchungen zur klinischen Anwendbarkeit einer intraoperativen Lymphknotenvitalfärbung mit Hilfe von Guajazulen.
Dissertation, Tübingen

4. Bremer, K., Higi, J., Niederle, N., Kloth, C., Krischke, W., Schmidt, C.G., Seeber, S., (1982)
Der retroperitoneale Befall als wesentlicher prognostischer Faktor bei disseminierten, nicht-seminomatösen Tumoren. 259-266
In: Illiger H.-J. et al: Nicht-seminomatöse Hodentumoren. S.Karger, Basel-München - Paris - London - New York - Sidney

5. Bruun, S., Engeset, A. (1956)
Lymphadenography. A new method for the visualisation of enlarged lymph nodes and lymph vessels.
Acta Radiol. 45, 389

6. Chavez, C.M. (1966)
A technique for experimental cannulation of the renal, testicular and cardiac lymphatics.
Surgery 59, 421

7. Chiappa, S., Uslenghi, C., Bonadonna, G., Morano, P., Ravasi, G. (1966)
Combined testicular and foot lymphangiography in testicular carcinomas.
Surg. Gynec. Obstet. 123, 10-16

8. Chicholska, A., Bolt, L., Meyer, J. (1976)
Microscopic Evaluation of Lymphonodular Reaction to Dye Preparations used in Chromolymphography.
Ginekol. Pol. 47, 403-411

9. David, E., Ikinger, U., von Kaick, G., Möhring, K. (1982)
Zur Wertigkeit der Echographie, Computertomographie und Lymphographie hinsichtlich der Diagnostik retroperitonealer Lymphknotenmetastasen bei malignen Hodenteratomen. 59-62
In: Illiger H.-J. et al: Nicht-seminomatöse Hodentumoren. S. Karger, Basel-München - Paris - London - New York - Sidney

10. Davidson, J.W., Clarke, E.A., Walker, D. (1967)
Radiographic appearences in Chromolymphography.
J. Ass. Canad. Radiol 19, 316-320

11. Dominok, G.W. (1964)
Die histologischen Veränderungen menschlicher Lymphknoten nach Lymphographien.
Virchows Arch. path. Anat. 338, 143

12. Elema, J.D., van Minden, S.H., Oldhoff, J. (1967)
Some experience with Chromolymphography.
Arch. Chir. Neerl. 19, 291-302

13. Fiedler, H.P. (1981)
Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie.
Editio Cantor Aulendorf, 972-975

14. Gerteis, W., Greuel, H. (1967)
Kontrastmittelembolie der Lunge bei Lymphographie (Untersuchungen bei physiologischem Lymphabfluß).
Fortschr. Röntgenstr. 106, 361

15. Gregl, A., Eydt, M., Krack, U., Fichtner, H.J. (1968)
Chromolymphographie der oberen Extremität.
Fortschr. Röntg. Nukl. med. 108, 565-576

16. Gregl, A., Kienle, J., Stelzner, J., Yu, D., Schoen, H. (1969)
Morphologische Veränderungen in den Lymphknoten nach Lipiodollymphographie.
Fortschr. Röntgenstr. 110, 297

17. Gulden van der, W.J.I., van Hooijdonk, C.L., de Jong, P., Kremer, A.K. (1975)
Versuchstiere und Versuchstechnik.
Veröffentlichungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Basel

18. Hall, R.C., Krementz, E.T. (1967)
Lymphangiography by lymph-node injection.
JAMA 202, 76

19. Harzmann, R., Bichler, K.-H. (1977)
Stellenwert der Lymphographie bei Tumoren der ableitenden Harnwege und des männlichen Genitale.
Med. Klin. 72, 183-197

20. Harzmann, R., Chiari, R., Dhom, G., Lenhardt, F.H (1978)
Indirekte Lymphographie der Harnblase im Tierversuch.
Urologe A 17,, 261-264

21. Harzmann, R., Häfelinger, G., Gärtner, H.-V., Schweinsberg (1982)
Chromolymphographie zur Selektivitätsverbesserung der Lymphadenektomie. 88-94
In: Illiger, J.H.: Nicht-seminomatöse Hodentumoren. S.Karger Basel-München - Paris - London - New York - Sidney

22. Harzmann, R., Gericke, D., Bichler, K.-H. (1982)
Präventive Onkologie beim Harnblasenkarzinom. Karzinogenerfassung im Urin.
Helv. Chir. Acta 49, 409-414

23. Harzmann, R., Gericke, D., Flücher St.H., Bichler, K.-H. (1984)
Möglichkeiten der Labordiagnostik zur Erfassung von Harnblasenkarzinogenen. 25-36
In: Bichler, K.-H., Harzmann, R.: Das Harnblasenkarzinom. Springer, Berlin-Heidelberg

24. Harzmann, R., Bausch, M., Häfelinger, G., Gaebel, G., Bichler, K.-H. (1985)
Intraoperative Lymphknotenvitalfärbung.
Verh. Dtsch. Ges. Urol. 36, 573-577

25. Hermanek, P. (1982)
Voraussetzungen einer modifizierten Lymphadenektomie beim Hodentumor. 95-101
In: Illiger, H.J. et al: Nicht-seminomatöse Hodentumoren, S. Karger, Basel-München - Paris - London - New York - Sidney

26. Hirnle, P. (1985)
Endolymphatic application of bleomycin oil suspension in dog model
Lymphology 18, 56-63

27. Hirnle, P., Harzmann, R., Wright, K.J., Frangos, A. (1986)
Liposomen als Farbstoffträger für die Chromolymphographie.
8. Symposium für Experimentelle Urologie, Mainz

28. Kinmonth, B.J. (1952)
Lymphangiography in man
Clinical science 11, 13-20

29. Kinmonth, J.B. (1977)
Lymphology. A review of some technical points.
Lymphology 10, 102

30. Kleinsorgen V.R., List P.H. (1981)
Emulsionen mit Lecithin.
Pharmazie in unserer Zeit, 10. Jahrg. Nr. 1, 8-17, Verlag Chemie, Weinsheim

31. Kolb, E. (1967)
Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.
Fischer, Jena 1967

32. Kopacz, A., Giedroyc, J., Zmarzlik, Z. (1977)
Value of Chromolymphography in the Diagnosis and Treatment of Melanoma Metastasis to Lymphnodes.
Pol. Przegl. Chir. 49, 305-312

33. Kuber, W., Leodolter, S. (1980)
Radioisotopenlymphonodektomie bei malignen Hodentumoren.
Urologe A 19, 25-31

34. Kubis, A., Witek, R., Olszewski Z., Krupa, U.S. (1979)
The Cytoxic Effect of Tween 80 on Ehrlich Ascites Cancer Cells in Mice.
Pharmazie 34, 745-746

35. Ludvik, W. (1965)
Vitalfärbung von Lymphknoten als Hilfsmittel der Lymphadenektomie.
Urol. int. 19, 390-409

36. Ludvik, W., Kindl, H. (1968)
Präoperative Vitalfärbung von Lymphknoten im Rahmen der Lymphographie.
Chir. Praxis 12, 1-6

37. Lüning, M., Wiljasalo, M., Weissleder, H. (1977)
Lymphographie bei malignen Tumoren.
Thieme Leipzig

38. Magnus, L., Stauch, G.W., Strötges, N.W. (1972)
Die pulmonale Strahlenbelastung nach endolymphatischer Therapie.
Strahlentherapie 144, Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien

39. Magnus, S.L. (1973)
Technik der Lymphographie an Kaninchen
Res. exp. Med. 161, 321

40. Maierhofer, G. (1985)
Liposomes: Preparation and application
Int. Lab., 92 -104

41. Martin, N.A., Swarbrick, J., A. Cammarata (1975)
Physikalische Pharmazie. Methode der Arzneibereitung und ihre physikalischen Grundlagen.
Urol. int. 19, 390-409
506-507, 510-511

42. Miroshnychenko, V.P., Pisachev, S.A. (1976)
Complications associated with the technique of Chromolymphography.
Tentgenol. Radiol. 2, 101-102

43. Murdock, H.R. jr. (1969)
Anesthesia in the rabbit.
Fed. Proc. 28, 1510

44. Nasner, A., Kraus L. (1982)
Neues aus der Lecithinforschung
D. Apothekerzeitung 122, Jahrg. 47, 2407-2515

45. Newton, D.W., Breen, P.J., Brown, D.E., Mackie, J.F.jr., Kluza, R.B. (1981)
Physicochemical Characteristics of Patent Blue.
J. Pharmaceut. Sci. 2, 122-127

46. Newton, D.W., Rogers, A.G., Becker, C.H., Torosian, G. (1975)
Evaluation of preparations of patent blue (Alphazurne 26) dye for parenteral use.
Am. J. Hosp. Pharm. 32, 912-917

47. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1976)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.
Parey, Berlin-Hamburg

48. Nowousian, M.R., Firusion, N., Konert, H.M., Rüther, U., Wilke, M., Schmidt, C.G. (1982)
Wertigkeit sonographischer Diagnostik bei retroperitoneal metastasierenden Hodentumoren. 65-71
In: Illiger, H.J.: Nicht-seminomatöse Hodentumoren. S. Karger, Basel - München - Paris - London - New York - Sidney.

49. Orecklin, J.R., Kaufmann, J.J., R.W. Thompson (1973)
Fertility in patients treated for malignant testicular tumors.
J. Urol. 109, 293-295

50. Papahadijopoulos, D. (1978)
Liposomes and their uses in biology and medicine
Ann. N.Y. Acad. Sci 308, 1-462

51. Peters, P.e., Weissleder, H. (1974)
Current sttus of endolymphatic therapy with radionuclides
Lymphology 7, 49

52. Petrova, J.V., S.A. Pysachov (1975)
Histomorphologic changes in the Lymphnodes following Chromolymphography in Cancer of the Uterus.
Pediatr. Akush. Ginekol. 6, 49-51

53. Prokopec, J., Kolihova, E (1958)
Die Lymphadenographie in der klinischen Praxis.
Fortschr. Röntgenstr. 89, 417

54. Prost, H., Altwein, J.E., Mayer, R., Bach, D. (1984)
Erektions- und Ejakulationsstörungen nach retroperitonealer Lymphadenektomie (RLA beim nicht-seminomatösen Hodentumor).
Urologe A 23, 324-328

55. Raghavaiah, N.V. (1979)
Prostatography
J. Urol. 121, 174-177

56. Raghavaiah, N.V., Jordan, W.P. jr. (1979)
Prostatic Lymphography.
J. Urol. 121, 178-181

57. Ravel, R. (1966)
Histopathology of lymph nodes after lymphography.
Am. J. clin. path. 46, 335

58. Ray, B., Steven, I., Whitmore, F.W. (1974)
Distribution of retroperitoneal lymph node metastases in testicular germinal tumors.
Cancer 33, 340-348

59. Remizov, A.L., Filov, V.A., Ivin, B.A., Bokhman, Y.A.V., Belogorodsky, V.V., R.M. Kuznetsova, R.M., Trifonova, L.F., Eglit, N.V., Vasiliev, B.V., Stukow, A.N. (1977)
Chromolymphotrast: A Medium for Color Lymphography.
Khim. Farm. ZH. 11, 144-147

60. Remizov, A.L., Y.A.V. Bokhman, Vasilev, B.V., Stukov, A.N., Tobilevich, V.P. (1979)
Chromolymphography in the Oncological Surgical Clinic.
Vestn. Khir. 120, 40-42

61. Rummelhardt, S. (1966)
Lymphography mit Lipiodol-Chlorophyll.
Z. Urol. Neurol. 58, 609-612

62. Rummelhardt, S., Fussek, H. (1970)
Die Lymphangiographie in der Urologie. Erfahrungen und Ergebnisse.
Akt. Klinik und Praxis 9, (6),

63. Schmidt-Mende, M., Mielke, J., Eisenberger, F., Spelsberg, F. (1967)
Zur Verbesserung der radikalen abdominellen Lymphadenektomie bei Hodentumoren. Eignung verschiedener Farbstoffe zur Chromolymphographie.
Münch.Med.Wschr. 109, 1417-1420

64. Siefert, H.M., Mützel, W., Schöbel, C., Weinmann, H.J., Wenzel-Hora, B.I., Speck, U. (1980)
Iotasul, a water-soluble contrast agent for direct and indirect lymphography. Results of preclinical investigations.
Lymphology 13, 150

65. Spelsberg, F., Schmidt-Mende, M., Kuss, R. (1968)
Experimentelle Untersuchungen zur intravitalen Anfärbung von Lymphgewebe. Chromolymphographie.
Langenbecks Arch. Chir. 322, 835-843

66. Tavel, F.R., Osius, T.G., Parker, J.W., Goodfrien, R.E., McGonigle, D.J., Jassie, M.P., Simmons, E.L., Tobenenkin, M.J., Schulze, J.W. (1963)
Retroperitoneal Lymphnode-Dissection.
J. Urol. 89, 241-245

67. Tjernberg, B. (1962)
Lymphography. An animal study on the diagnosis of Vx2 carcinoma and inflammation.
Acta Radiol. (Stockholm) 1962, (Suppl 214)

68. Voigt, R. (1984)
Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 325-334

69. Weißbach, L., Bode, H.U. (1982)
Die modifizierte Lymphadenektomie zur Protektion der Ejakulation. 133-138
In: Illiger, H.J. et al: Nicht-seminomatöse Hodentumoren. S.Karger Basel-München - Paris - London - New York - Sidney

70. Weisbroth, S.H., Flatt, F.E., Kraus, A.L. (1974)
The biology of the laboratory rabbit.
Academic Press. New York - London

71. Zerbino, D., Gelfot, M.M., Kolbenstved, C. (1975)
Chromolymphographie und Vitalfärbung von Lymphgefäßen und Lymphknoten. 281-284
In: Lüning, M. et al: Lymhographie bei malignen Tumoren. G. Thieme Stuttgart

D A N K S A G U N G

Bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit haben mich folgende Persönlichkeiten in dankenswerter Weise unterstützt:

- Professor Dr. Harzmann, Urologische Universitätsklinik Tübingen, der mir das Thema überlassen und das Manuskript korrigiert hatte.

- Dr. Hirnle, Universitätsfrauenklinik Tübingen, der das Projekt im Tierlabor der Universitätsfrauenklinik Tübingen geleitet hat.

- Dr. rer. nat. Heide, Universitätsapotheke Tübingen, der die angewandten Präparationen hergestellt und ihre Viskosität gemessen hat.

- P. D. Dr. Schweinsberg, Hygiene-Institut Universität Tübingen, der die Methode der Konzentrationsbestimmung von Guajazulen entwickelt hat.

- Professor Dr. Häfelinger, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, für die Beratung in den Themen Organische Chemie.

- Dr. Geppert, Universitätsfrauenklinik Tübingen, für die Begutachtung der histologischen Schnitte.

- Frau Bidermann, die eine perfekte technische Assistenz bei Tierversuchen geleistet und die histologischen Präparate vorbereitet hat.

L E B E N S L A U F

Am 31. Dezember 1955 wurde ich, Anastassios Frangos-Petas, als Sohn des Stefanos Frangos-Petas in Archangelos, Rhodos, Griechenland, geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und das Gymnasium. Im Juni 1973 bestand ich das Abitur.

Im Herbst 1973 begann ich das Medizinstudium an der Universität Bologna, Italien. Im Sommer 1979 schrieb ich die dort erforderliche Diplomarbeit mit dem Thema "Der Einfluß der Ernährung auf das Vorkommen des Colonkarzinoms". Am 15. Oktober 1979 bestand ich in Bologna, Italien, das medizinische Staatsexamen.

Vom 4. Dezember 1979 bis 4. Oktober 1981 leistete ich meinen Militärdienst als Arzt in Pastida, Rhodos, Griechenland, ab.

Vom 7. Juli 1982 bis 24. Februar 1983 arbeitete ich in der Urologischen Abteilung der Universitätskliniken Tübingen (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler) als Hospitant. Im Februar 1983 nahm ich dort meine Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter auf.

Vom 15. März 1985 bis 31. März 1986 absolvierte ich in der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Koslowski) das für die Fachausbildung erforderliche chirurgische Jahr. Vom 1. April 1986 bis 9. September 1986 war ich in der Urologischen Abteilung der Universitätskliniken Tübingen wiederum als wissenschaftlicher Angestellter tätig.

Seit dem 10. September 1986 arbeite ich in der Urologischen Klinik des Städtischen Klinikums Karlsruhe (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. E. Matouschek).

Seit dem 21. April 1985 bin ich mit Frau Triadafillia Frangos-Petas, geborene Argiru, verheiratet. Am 21. September 1986 ist mein Sohn, namens Stefanos, geboren.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45